

**STUDIEN ZUR FUNKTION VON KALIUMKANALPROTEINEN AUS  
VIREN EUKARYOTISCHER ALGEN (*PHYCODNAVIRIDAE*)**

vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium  
genehmigte Dissertation von

**Mario Mehmel**  
aus Büdingen

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas W. Holstein

Tag der Einreichung: 30. April 2004  
Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 2004

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>II</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
Viroporine.....	1
Kcv – ein viraler Kaliumkanal.....	2
Die Familie der Phycodnaviridae .....	3
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>8</b>
2.1. <i>kcv</i> -Expressionsstudien - in welcher Phase des Replikationszyklus von <i>Paramecium bursaria</i> Chlorella Virus wird Kcv synthetisiert? .....	8
2.1.1. Transkription des <i>kcv</i> -Gens in infizierten Chlorella NC64A-Zellen.....	8
2.1.2. Versuche zum Nachweis von Kcv Protein im Virion von PBCV-1 .....	12
2.2. Das Membranpotential der Wirtszelle Chlorella NC64A ändert sich während der Infektion mit PBCV-1 .....	16
2.3. Sind virale Kaliumkanäle einzigartig für Chlorellaviren? Nachweis der Funktion eines Kaliumkanals aus <i>Ectocarpus siliculosus</i> Virus EsV-1 .....	22
2.3.1 Ectocarpus siliculosus Virus EsV-1 kodiert ein Kaliumkanal-ähnliches Protein.....	22
2.3.2. Heterologe Expression von Kev .....	24
2.3.3. Expression einer Chimäre aus Kev und Kcv – die Porenregion von Kev vermittelt K <sup>+</sup> -selektive Leitfähigkeit.....	29
2.4. Kcv und Kev im heterologen Expressionssystem HEK293.....	35
2.4.1. Unterschiedliche zelluläre Verteilung von Kcv und Kev.....	36
2.4.2. Einfluss der Länge von Transmembrandomänen auf die zelluläre Verteilung .....	39
2.4.3. Elektrophysiologische Untersuchung von Kev-Mutanten mit verlängerten Transmembrandomänen .....	41
<b>3. Diskussion</b>	<b>45</b>
3.1. Mögliche Funktion des viralen Kaliumkanals Kcv im Replikationszyklus von <i>Paramecium bursaria</i> Chlorellavirus .....	45
3.2. Das Genom des <i>Ectocarpus siliculosus</i> Virus kodiert eine funktionelle Kaliumkanalpore .....	50
<b>4. Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>5. Material und Methoden</b>	<b>55</b>
5.1. Kultur von Chlorella NC64 und Reinigung der Chlorellaviren.....	55
Algenkultur.....	55
Aufreinigung von Chlorellaviren.....	55
Bestimmung von Virustitern.....	55
5.2. Messungen mit spannungsabhängigem Fluoreszenzfarbstoff.....	56
5.3. Proteinbiochemische Methoden .....	56
Proteinbestimmung .....	56
Temperaturinduzierte Triton X-114 Zwei-Phasentrennung .....	56
SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	56
Färbung von Polyacrylamidgelen.....	57
MALDI-TOF .....	57

<i>5.4. Molekularbiologische Methoden</i> .....	57
Bakterienstämme .....	57
Transformation von <i>E. coli</i> .....	57
Plasmidpräparationen .....	58
Standard-PCR .....	58
RNA-Isolierung aus PBCV-1-infizierten <i>Chlorella</i> NC64A-Zellen .....	58
RACE-PCR .....	58
Northern-Hybridisierung .....	59
Konstruktion von Expressionsvektoren .....	60
Konstruktion von GFP-Fusionsproteinen .....	60
Expression von Kev und chimären Proteinen .....	61
<i>5.5. Confokalmikroskopie</i> .....	61
<i>5.6. Elektrophysiologie</i> .....	61
<i>5.7. Verwendete Chemikalien und Enzyme</i> .....	62
<i>5.8. Software, Internetadressen und GenBank Nummern</i> .....	62
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>63</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>70</b>
Aminosäuren, Ein- und Dreibuchstabencode .....	71
<b>Danksagung</b> .....	<b>73</b>

## 1. EINLEITUNG

### *Viroporine*

Viruskodierte Proteine, die den Durchtritt von Ionen und kleineren Molekülen durch Membranen vermitteln werden als Viroporine bezeichnet (Carrasco 1995). Bis heute wurden Viroporine in Viren aus neun Familien beschrieben (Gonzales und Carrasco 2003). Beispiele solcher Proteine sind M2 aus Influenza A Virus (*Orthomyxoviridae*), Vpu aus dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV, *Retroviridae*), 2B aus Poliovirus (*Picornaviridae*) und Kcv aus Chlorellavirus (*Phycodnaviridae*).

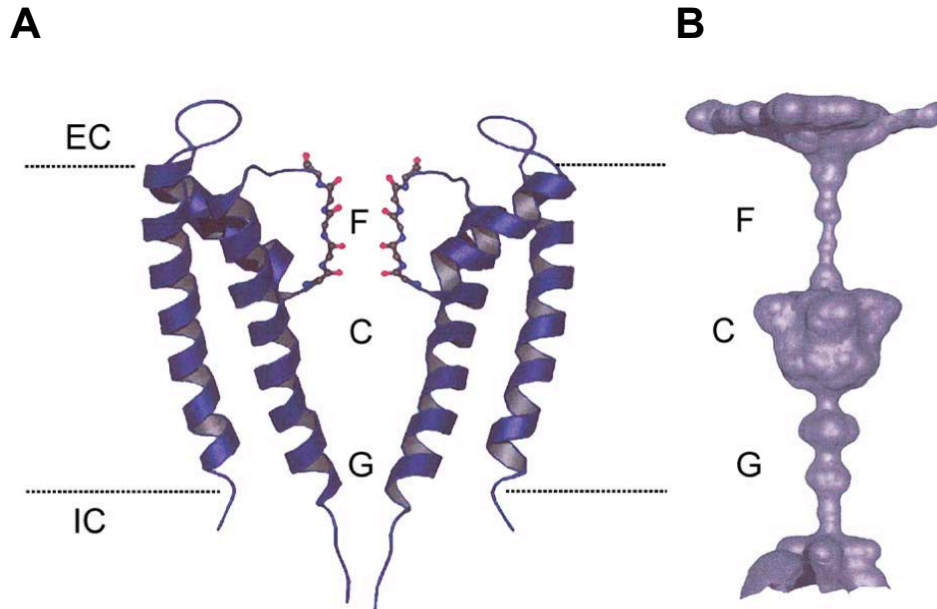
Die genaue physiologische Funktion der Viroporine im Replikationszyklus der Viren ist in den meisten Fällen ungeklärt. Eine Ausnahme bildet das M2 Protein aus dem humanpathogenen Influenza A Virus. M2 bildet als tetrameres Protein einen Protonenkanal, der zwei unterschiedliche Aufgaben bei der viralen Replikation erfüllt: (i) Nach der endocytotischen Aufnahme von Influenza A durch eine Zelle vermittelt M2 die Ansäuerung des Virions. Dies führt zu einer pH-abhängigen Strukturänderung von Hämagglutinin (HA), eines weiteren viralen Strukturproteins. Eine Fusion der inneren Virusmembran mit der endosomalen Membran ist die Folge. Gleichzeitig wird die Entfaltung des Capsids (*uncoating*) und damit die Freisetzung des Ribonukleoproteinkerns unterstützt (Martin und Helenius 1991, Lamb und Pinto 1997). (ii) In einer späteren Phase der Virusreplikation wird durch die M2-Aktivität der pH-Wert im Lumen des Trans-Golgi-Netzwerks mit dem Cytoplasma äquilibriert. Dadurch wird die (pH-abhängige) Struktur von neu synthetisiertem HA stabilisiert, die für die Infektiosität der Virusnachkommen nötig ist (Sugrue *et al.* 1990, Grambas und Hay 1992). Die Funktion von Vpu aus HIV ist ebenfalls besonders gut untersucht. Das Protein bildet in heterologen Expressionssystemen (Ewart *et al.* 2002) und rekonstituiert im Lipid-bilayer (Schubert *et al.* 1996) einen Kationenkanal. Auch Vpu scheint zwei unabhängige physiologische Funktionen zu erfüllen: (i) Vpu-Aktivität unterstützt am Endoplasmatischen Retikulum (ER) den Abbau des zelleigenen Rezeptors CD-4, der HIV als Erkennungssignal dient. Damit verhindert Vpu also indirekt die Infektion der Zelle durch weitere HI-Viren (Chen *et al.* 1993). (ii) Vpu scheint außerdem durch eine Erhöhung der Plasmamembran-Permeabilität die Freisetzung von Virusnachkommen zu verstärken (Schubert *et al.* 1996).

Für alle weiteren viralen Kanäle wird derzeit eine Rolle bei der Infektion, bei der Modifikation des physiologischen Zustands der Wirtszelle oder bei der Freisetzung von Virusnachkommen diskutiert (Carrasco 1995). Allgemein ist die Änderung der Permeabilität von Plasmamembran oder Endomembranen als physiologische Funktion der Viroporine anzusehen. Es soll aber nicht unerwähnt bleiben, dass Permeabilitätsänderungen auch durch die Aktivitäten von anderen viralen Genprodukten wie Proteasen (Chang *et al.* 1999, Blanco *et al.* 2003) oder Glykoproteinen (Dong *et al.* 1997, Comardelle *et al.* 1997) herbeigeführt werden können.

Änderungen der Permeabilität von Zellmembranen wurden auch bei der Infektion durch Phagen, den Viren der Prokaryoten, beobachtet. Bei der Infektion von *Escherichia coli* durch Phage T5 kommt es zu einem Efflux von K<sup>+</sup>-Ionen aus dem Cytoplasma; dieser Efflux ist an die Injektion der Phagen-DNA in die Zelle gebunden (Boulanger und Letellier 1988, Letellier *et al.* 2003). K<sup>+</sup>-Efflux und die Änderung des Membranpotentials der Wirtszellen wurde auch bei Infektionen durch die Phagen T1, T4,  $\lambda$  und PRD1 beobachtet (Boulanger und Letellier 1992, Grinius *et al.* 1981, Dangelavicius *et al.* 1997).

*Kcv – ein viraler Kaliumkanal*

Die Sequenzierung des Genoms von *Paramecium bursaria* Chlorellavirus PBCV-1 lieferte ein Offenes Leseraster (ORF a250r), dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zu bekannten Kaliumkanalsequenzen hat. Kaliumkanäle sind membranintegrale Proteine, welche Lipid-bilayer durchspannen und eine zentrale Pore bilden, die den selektiven Durchtritt von  $K^+$ -Ionen erlauben (Abb. 1). Der Transport durch Kaliumkanäle folgt passiv dem elektrochemischen Gradienten von  $K^+$ -Ionen mit einer Rate, die beinahe die diffusionslimitierte Geschwindigkeit erreicht (Hille 2001). Kaliumkanäle, die physikalisch, z.B. durch Dehnung oder elektrische Spannung, oder chemisch (ligandenabhängig) aktiviert werden, kontrollieren die Membranspannung einer Vielzahl von Zelltypen in Tieren und Pflanzen (Hille 2001). Kaliumkanäle werden auch in Prokaryoten und niederen Eukaryoten gefunden und existieren vermutlich in allen Lebensformen. Im Gegensatz zu den beschriebenen Viroporinen, die keine Ähnlichkeiten zu bekannten Kanalproteinen aufweisen, hat Kcv alle Merkmale, die auch eukaryotische Kaliumkanalproteine auszeichnen. Die heterologe Expression von Kcv in Säugerzellen (Moroni *et al.* 2002) und in Oozyten von *Xenopus laevis* (Plugge *et al.* 2000) erzeugte eine  $K^+$ -selektive Leitfähigkeit. Diese  $K^+$ -Leitfähigkeit zeigte eine gewisse Spannungsabhängigkeit und war durch Kaliumkanalhemmstoffe zu inhibieren. Kcv ist der erste bekannte Kaliumkanal aus einem Virus. Mit 94 Aminosäuren bildet Kcv darüber hinaus den kleinsten funktionellen Kaliumkanal (Plugge *et al.* 2000) und ist deshalb als Minimalmodell für die Aufklärung von Struktur-Funktions-Zusammenhängen bei Kaliumkanalproteinen besonders geeignet (Gazzarrini *et al.* 2003, Kang *et al.* 2004).



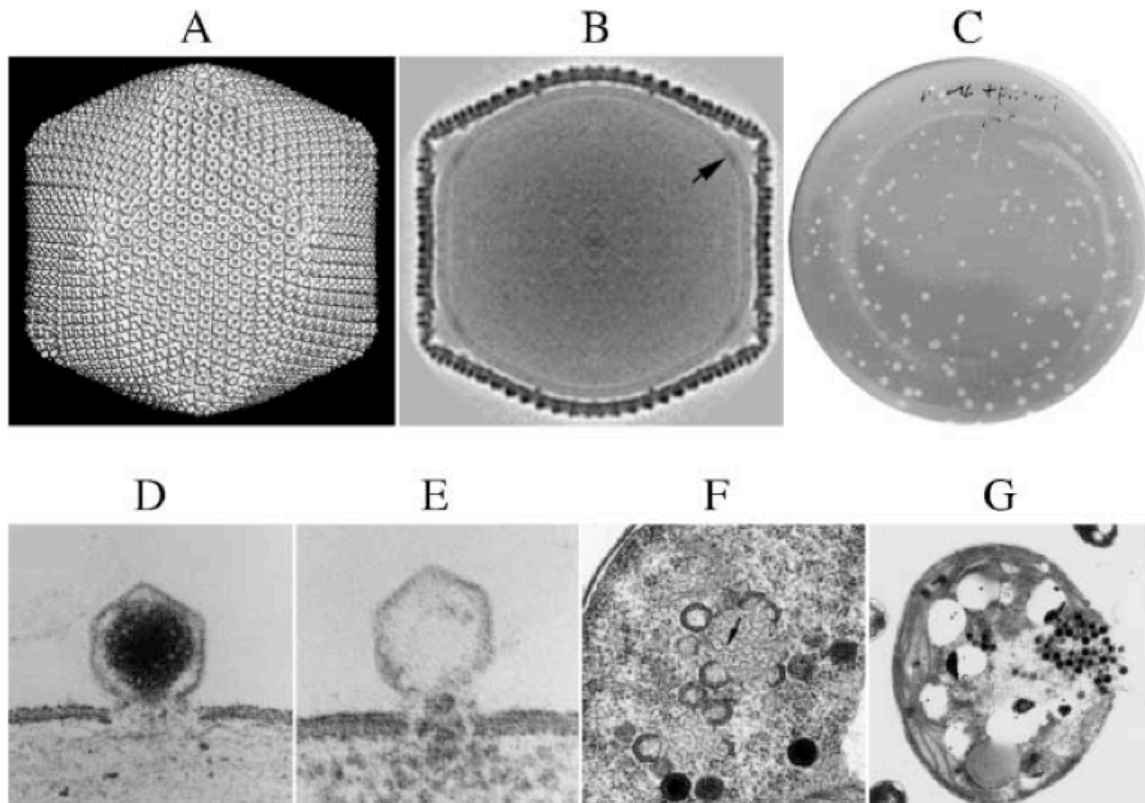
**Abb. 1:** Proteinfaltung und Pore von KcsA, einem bakteriellen Kaliumkanal. (A) Zwei von vier Proteinuntereinheiten sind in der Seitenansicht gezeigt. Helices sind als Band und das Rückgrat der Filterregion im Kugel-Stab-Format dargestellt. Die Lipiddoppelmembran ist durch unterbrochene Linien angedeutet, sie grenzt die extrazelluläre Seite (EC) zur intrazellulären Seite (IC) ab. (B) Die innere Oberfläche von KcsA ist neben dem Modell (A) angeordnet. Drei wichtige funktionelle Bereiche des Kaliumkanals werden sichtbar: die Filterregion (F), die Cavität (C) und das Tor (gate, G). (Aus Sansom *et al.* 2002).

Über die physiologische Rolle von Kcv war bislang wenig bekannt aber es gibt einen deutlichen Hinweis darauf, dass der Kanal für die Vermehrung des Chlorellavirus essentiell ist: Kaliumkanalhemmstoffe wie Barium und Amantadin hemmten die Aktivität von Kcv (heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert) etwa mit dem gleichen Dosis-Wirkungs-Verhältnis wie auch die Replikation des Virus in *plaque*-Tests gehemmt wurde (Plugge *et al.* 2000). Was aber ist die Funktion von Kcv im Replikationszyklus des Chlorellavirus? Dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen. Dazu wurden zum einen Untersuchungen zur Transkription des *kcv*-Gens angestellt. In weiteren Experimenten wurde versucht das Kcv-Protein im Viruspartikel (Virion) nachzuweisen, da sich Hinweise auf die Lokalisation des Proteins im Virion fanden. Wie beschrieben, beeinflussen Viroporine die Leitfähigkeiten von Membranen des Wirts. Deshalb wurde die Membranspannung von *Chlorella* NC64A während der Infektion mit Chlorellaviren und die mögliche Beteiligung von Kcv an Änderungen der Membranspannung untersucht.

### *Die Familie der Phycodnaviridae*

Mitglieder der Familie *Phycodnaviridae* haben eine eikosaedrische Morphologie, eine interne Lipidmembran und große doppelsträngige (ds) DNA-Genome von 180 bis 560 kb (Kilobasen) (Van Etten *et al.* 2002). Diese Viren sind weltweit verbreitet und ihre Wirte sind eukaryotische Algen verschiedener Ordnungen. Die Familie *Phycodnaviridae* umfasst zur Zeit vier Gattungen: *Chlorovirus*, *Prasinovirus*, *Prymnesiovirus* und *Phaeovirus* (Van Etten 2000). Nur Mitglieder der Gattung *Chlorovirus*, wie PBCV-1, infizieren Süßwasseralgen. Alle weiteren Arten der *Phycodnaviridae* haben marine Algen als Wirte. Die Gattung *Prasinovirus* infiziert *Micromonas pusilla*, der Wirt der Gattung *Prymnesiovirus* ist *Chrysochromulina brevifilum* und Viren der Gattung *Phaeovirus* infizieren Braunalgen wie *Feldmannia*, *Hicksia* oder *Ectocarpus* (ICTVdB, Internationales Komitee zur Taxonomie der Viren). Phytoplankton, das sich aus Cyanobakterien und eukaryotischen Algen zusammensetzt, produziert 40% der Photosyntheseprodukte auf der Erde (Goodwin 1983). Den Viren dieser Algen, die nicht selten lytische Viren sind, kommt deshalb eine bedeutende Rolle in der Ökologie der Meere zu. Das Ende von „Braunen Fluten“, die durch *Aureococcus anophagefferens* hervorgerufen werden (Milligan und Cosper 1994), von „Roten Fluten“ durch *Heterosigma akashivo* (Tarutani *et al.* 2000) und weiteren Algenblüten (Fuhrmann 1999) wurde mit den jeweiligen Viren in Verbindung gebracht.

Bei weitem am besten untersucht ist aber ein Virus aus dem Süßwasser, das Chlorellavirus PBCV-1 (Gattung *Chlorovirus*; Abb. 2). Der Wirt von PBCV-1 ist eine *Chlorella*-ähnliche Grünalge. *Chlorella* ist eine der am weitesten verbreiteten Gruppe von Grünalgen, die hauptsächlich in Süßwasser und mit wenigen Arten auch im Meer vorkommen (van den Hoek *et al.* 1993). Der Stamm *Chlorella* NC64A, der von Chlorellaviren wie PBCV-1 infiziert wird, kommt in der Natur nur als ein Endosymbiont des Pantoffeltierchens *Paramecium bursaria* vor. In *Paramecium* ist jede Alge einzeln von einer Membran umschlossen und wird auf die folgende Generation weiter vererbt; eine Infektion mit PBCV-1 kann hier nicht stattfinden (Reisser *et al.* 1988). Glücklicherweise gelingt die Kultur der Algen im Labor in geeigneten Medien auch außerhalb von *Paramecium* (Kawakami und Kawakami 1978, Meints *et al.* 1981). Unter diesen Bedingungen ist die Infektion mit Chlorellaviren zu beobachten. Mit der Entwicklung von *plaque*-Tests für das Chlorellavirussystem (Abb. 2 C) steht eine wichtige Standardmethode der Virologie für das Studium dieser Viren zur Verfügung (Van Etten *et al.* 1982).



**Abb. 2:** Struktur und Lebenszyklus von *Paramecium bursaria* Chlorellavirus, PBCV-1. (A) dreidimensionale Computer-Rekonstruktion des Capsids von PBCV-1 aus elektronenmikroskopischen Daten. (B) Querschnitt durch eine 3-dimensionale Rekonstruktion. Das Capsid und die darunter liegende interne Virus-Membran (Pfeil) werden sichtbar. (C) Ein plaque-Test. Virusinfektionen werden als Lysehöfe auf einem Rasen von *Chlorella* NC64A sichtbar. (D-G) Die Infektion von *Chlorella* NC64A mit PBCV-1: (D) Verdau der Zellwand am Punkt der Anheftung. (E) Der Inhalt des Virus wird in die Zelle entlassen. (F) Virus-Assemblierungs-Zentren im Cytoplasma der Wirtszelle 3-4 Stunden nach der Infektion. (G) Lyse der Wirtszelle und Freisetzung der Virusnachkommen 6-8 Stunden nach der Infektion. (Aus Van Etten *et al.* 2002).

Die Struktur von Chlorellaviruspartikeln ist komplex. Das Virion enthält mindestens 50 Strukturproteine (Skrdla *et al.* 1985). Wie dreidimensionale Rekonstruktionen aus elektronenmikroskopischen Bildern zeigen, bildet das Hauptprotein Vp54 das eikosaedrische Capsid der Viren (Abb. 2 A). Unterhalb des Capsids liegt ein Lipid-bilayer (Abb. 2 B). Die Herkunft dieser inneren Membran ist nicht bekannt. Das dsDNA-Genom der Chlorellaviren ist linear mit etwa 330 kb.

Der Lebenszyklus von PBCV-1 verläuft lytisch, d.h. jede infizierte Zelle stirbt nach der Virusvermehrung. PBCV-1 infiziert den Wirt durch eine schnelle, irreversible Anheftung an die Zellwand der Alge. Diese Anheftung geschieht immer an einem Vertex (Eckpunkt des Capsids) und wird gefolgt von einem partiellen Verdau der Zellwand unterhalb der Kontaktstelle durch ein Enzym aus dem Virion (Abb. 2 D) und der Entlassung von Virus-DNA und Proteinen in die Zelle (Abb. 2 E). Die virale DNA gelangt danach in den Kern der Algenzelle, wo die Transkription viraler Gene beginnt. Dieser Prozess geschieht sehr schnell: Virus mRNA ist schon 5 Minuten nach der Infektion (p.i., *post infection*) detektierbar (Schuster *et al.* 1986). Die Transkription der Gene des Wirts wird unterdrückt. Die Replikation der viralen DNA beginnt 60-90 Minuten p.i. und wird gefolgt von der Transkription später viraler Gene. Etwa 2 Stunden p.i. beginnt der Zusammenbau neuer Capside in bestimmten Regionen des Cytoplasmas, den sogenannten Assemblierungs-Zentren

(Abb. 2 F). Nach 5 Stunden ist das Cytoplasma gefüllt mit Virusnachkommen (~700 Partikel pro Zelle) und die nach 6-8 Stunden durch die Lyse der Wirtszelle entlassen werden (Abb. 2 G). Etwa 50% der Virusnachkommen sind infektiöse Partikel (Van Etten *et al.* 1983).

Eine andere Chlorellavirus-Art infiziert den Stamm *Chlorella* Pbi, welcher ebenfalls Endosymbiosepartner von *Paramecium* ist (Van Etten und Meints 1999). Mitglieder einer dritten Chlorellavirus-Art infizieren symbiotische Chlorellen aus dem Coelenteraten *Hydra viridis* (Van Etten *et al.* 1982). Diese lytischen Viren haben ebenfalls eine eikosaedrische Morphologie und große dsDNA-Genome. Bislang ist es nicht gelungen diese Chlorellen frei von Viren ausserhalb des Symbiosepartners zu kultivieren. Daher können die Viren dieser Art nur aus frisch isolierten Hydren gewonnen werden (Van Etten *et al.* 2002).

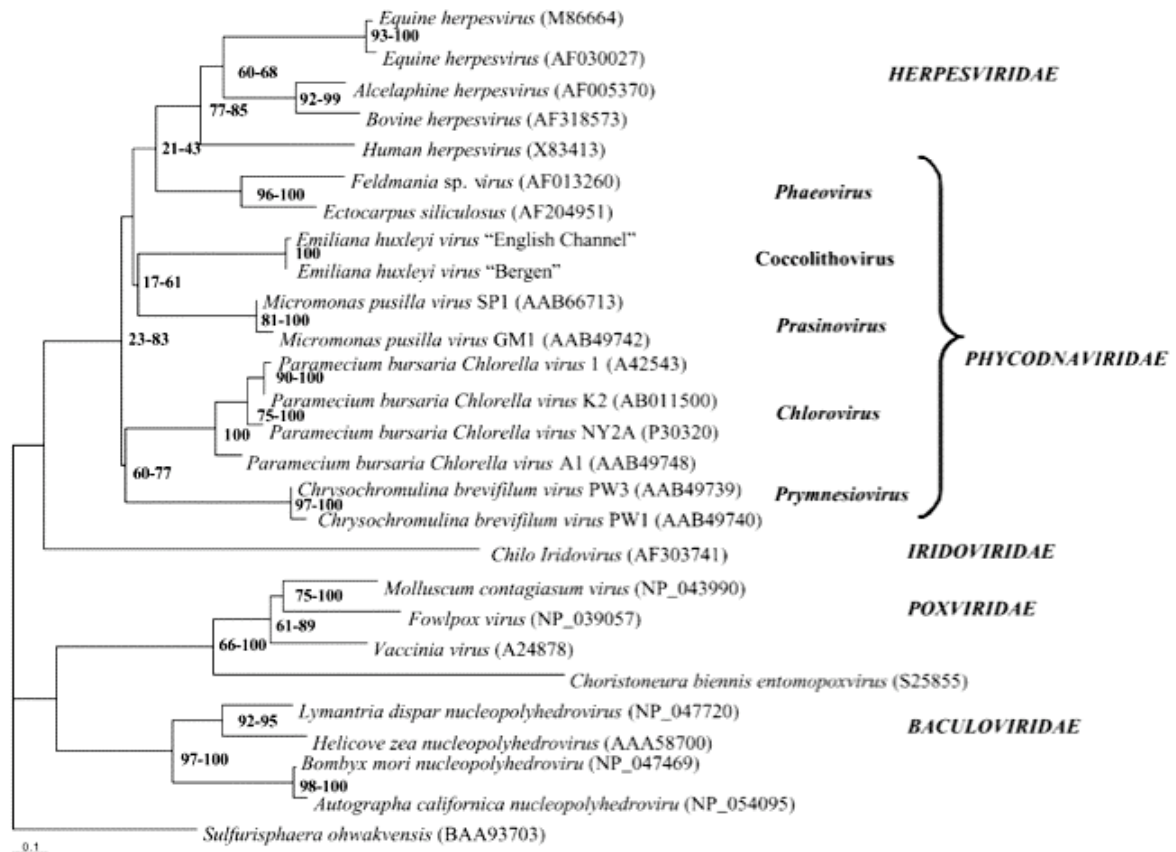
Das Genom eines weiteren Virus der Familie *Phycodnaviridae* ist ebenfalls vollständig sequenziert: *Ectocarpus siliculosus* Virus EsV-1 (Delaroque *et al.* 2001). Der Lebenszyklus von EsV-1 unterscheidet sich deutlich von dem der Chlorellaviren (Kapp 1998). EsV-1 infiziert die fädige Braunalge *Ectocarpus siliculosus*, die an allen Meeresküsten gemäßigter Breiten vorkommt. Die Braunalge hat eine sexuelle Fortpflanzung mit Generationswechsel, d.h. mit Wachstumsphasen, bei denen vielzellige Wuchsformen mit einfachem (haploidem) Chromosomensatz im Wechsel mit Wuchsformen mit doppeltem (diploidem) Chromosomensatz heranwachsen. Männliche und weibliche (haploide) Gametophyten entlassen bewegliche Isogameten. Nach der Verschmelzung zur diploiden Zygote wächst der Sporophyt heran, der entweder diploide Sporen oder haploide Meiosporen ins Meerwasser entlässt. Die beweglichen Verbreitungsformen Gameten und Sporen besitzen im Gegensatz zu den vegetativen Zellen keine Zellwand. Das Ectocarpusvirus infiziert nur diese zellwandlosen einzelligen Formen. Schwimmen Gameten oder Meiosporen in Wolken frisch entlassener Viruspartikel, dann stoppt die Flagellenbewegung und die Zelle sinkt zu Boden. Aus infizierten Sporen und Gameten wachsen danach gesunde, vielzellige Algen heran. Anders als bei Chlorellaviren zeigt EsV-1 einen lysogenen Replikationszyklus. Nach der Infektion wird das Virusgenom ins Wirtsgenom integriert und in Mendelscher Weise weiter vererbt (Delaroque *et al.* 1999). Die Vermehrung und Freisetzung von EsV-1 geschieht nur in den Sporangien und Gametangien. Das sind die Reproduktionsorgane der Sporophyten bzw. Gametophyten, in denen die Ausbildung von Sporen bzw. Gameten stattfindet. Im Labor kann das Auftreten von Viruspartikeln aus den Reproduktionsorganen durch verschiedene Stimuli wie den Wechsel von Temperatur, Licht oder Salinität induziert werden (Kapp 1998). Die Zelllyse zur Freisetzung der Viren scheint nicht Virus-induziert zu sein. Da die Freisetzung von reproduktiven Zellen ohnehin zur Funktion der Reproduktionsorgane gehört, überleben die Braunalgen die Virusreplikation unbeschadet. Das Wirtsspektrum von EsV-1 ist nicht auf *E. siliculosus* beschränkt. Mindestens zwei weitere fädige Braunalgen werden außerdem infiziert, *Kuckuckia spec.* und *Feldmannia simplex*. Deshalb wurde für EsV-1 die Möglichkeit diskutiert, als Vektor für nicht-sexuellen Gentransfer auch zwischen verschiedenen Arten zu fungieren (Reaney 1974).

Das Genom des *Ectocarpus siliculosus* Virus ist mit 335 kb bisher das größte vollständig sequenzierte Virusgenom und kodiert wahrscheinlich 231 Proteine (Delaroque *et al.* 2001). Für das etwas kleinere Genom von PBCV-1 werden 376 Protein-kodierende Gene vermutet (Van Etten und Meints 1999). Obwohl die beiden Viren derselben Virusfamilie angehören unterscheiden sie sich in ihrer Gen-Ausstattung erheblich: beide Viren haben nur 33 homologe Gene (Van Etten *et al.* 2002). Was auf eine lange evolutive Geschichte beider Viren hinweist. Dies wird auch aus einer anderen Überlegung deutlich: Einzellige Grünalgen wie die Chlorellen werden als sehr ursprüngliche Eukaryonten betrachtet. Sollten Chlorellaviren zusammen mit ihren Wirten evolviert sein, dann würde das bedeuten, dass



## 1. Einleitung

Chlorellaviren schon seit über einer Milliarde Jahre existieren (Heckman *et al.* 2001). Ein Sequenzvergleich von DNA-Polymerase-Untereinheiten aus verschiedenen *Phycodnaviridae* zeigt die Verwandtschaft in dieser Familie und zu anderen Virusfamilien (Abb. 3, Schroeder *et al.* 2002).



**Abb. 3:** Phylogenetische Beziehung von *Phycodnaviridae* und anderen dsDNA Viren. Für den Vergleich (mit ClustalW) wurden hoch konservierte Bereiche einer DNA Polymerase Untereinheit verwendet. Zahlen an den Knotenpunkten bezeichnen *bootstrap*-Werte aus 100 Wiederholungen. (Aus Schroeder *et al.* 2002).

Zu den wenigen Proteinen, die im Genom sowohl von PBCV-1 als auch von EsV-1 kodiert sind, gehören vermutlich Kaliumkanäle: Die abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF 223 aus EsV-1 hat große Ähnlichkeit zur Sequenz des Kaliumkanals Kcv aus PBCV-1 (Delaroque *et al.* 2001). Die Sequenz enthält außerdem eine Folge von acht Aminosäureresten mit der Kaliumkanal *signature-sequence*, die in allen bekannten prokaryotischen und eukaryotischen Kaliumkanälen hoch konserviert ist (Heginbotham *et al.* 1994, MacKinnon 2003). Auch verfügt die Aminosäuresequenz aus ORF 223 über mögliche hydrophobe Bereiche, welche die Membrandomänen des putativen Kaliumkanals darstellen könnten. Die Aminosäuresequenz zeigt damit wichtige strukturelle Voraussetzungen eines Kaliumkanals.

## 1. Einleitung

Um zu überprüfen ob das EsV-1 ORF 223 tatsächlich einen funktionellen Kaliumkanal kodiert, wurde das Gen in einem weiteren Versuchsteil der vorliegenden Arbeit heterolog exprimiert. Mit Standardmethoden der Elektrophysiologie wurde getestet ob das virale Gen in den Zellen des Expressionssystems Leitfähigkeitsänderungen mit Kaliumkanaleigenschaften induzieren konnte. Aus diesen Studien liessen sich dann möglicherweise Schlüsse ziehen auf eine grundlegende Bedeutung von Kaliumkanälen als Viroporine der *Phycodnaviridae* EsV-1 und PBCV-1

## 2. ERGEBNISSE

### 2.1. *kcv*-Expressionsstudien - in welcher Phase des Replikationszyklus von *Paramecium bursaria* Chlorella Virus wird Kcv synthetisiert?

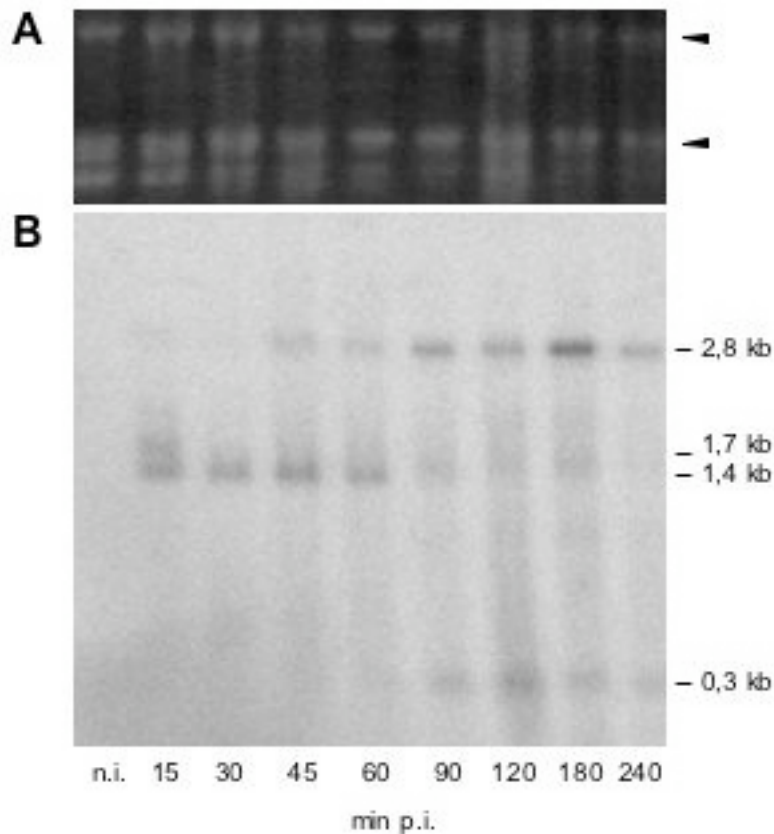
Kcv ist der erste Kaliumkanal, der aus dem Genom eines Virus abgeleitet wurde. Die elektrophysiologischen Eigenschaften von Kcv wurden in heterologen Expressionssystemen studiert. Über die Funktion des viralen Kaliumkanals im Virus/Wirt-System ist aber wenig bekannt. Um mehr über die physiologische Rolle von Kcv während des viralen Replikationszyklus zu erfahren wurde deshalb zunächst die Expression des Kaliumkanals untersucht. Die *kcv*-Transkription - der erste Schritt in der Proteinbiosynthese – wurde in den folgenden Experimenten untersucht.

#### 2.1.1. Transkription des *kcv*-Gens in infizierten *Chlorella* NC64A-Zellen

##### *Northern-Blot-Analyse von kcv und flankierenden Genen*

Gesamt-RNA aus PBCV-1-infizierten und nicht-infizierten *Chlorella*-Zellen wurde mit einzelsträngigen, radioaktiv markierten *kcv*-Sonden behandelt. Die *kcv*-Transkription zeigte ein komplexes Muster (Abb. 4). Der zeitliche Verlauf der Transkription verlief in zwei Phasen: ab 15 min nach der Infektion (p.i., *post infection*) wurden zwei RNA-Banden mit 1,4 und 1,7 kb markiert, welche nach 60 min verschwanden. Nach 60 min p.i. wurden zwei Banden mit 0,3 bzw. 2,8 kb von der Kcv-Sonde markiert. Im Replikationszyklus lytischer Viren unterscheidet man die frühe Phase, welche bis zur Replikation viraler DNA andauert, von der späten Phase, welche mit der Replikation der viralen DNA beginnt. Bei PBCV-1 beginnt die Synthese viraler DNA 60-90 min p.i. (Van Etten *et al.* 1994).

Zusätzlich wurde Gesamt-RNA mit Sonden behandelt, die spezifisch gegen die beiden *kcv*-flankierenden Gene gerichtet waren. Die Untersuchung der *kcv*-flankierenden Gene sollte es ermöglichen *kcv*-kodierende Transkripte zu charakterisieren, die deutlich größer als das *kcv*-Gen mit 285 Nukleotiden waren. Auf dem PBCV-1 Genom liegt stromaufwärts von *kcv* ORF a248r welches *pkx*, eine Proteinkinase, kodiert (Que and Van Etten 1995). Stromabwärts liegt ORF a251r. Dieses Gen kodiert M.CviAII, eine DNA-Methyltransferase (Zhang *et al.* 1992). In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der verschiedenen Northern-Hybridisierungen zusammengefasst.



**Abb. 4:** Northern-Blot-Analyse von *kcv*. (A) Gesamt-RNA wurde aus nicht infizierten *Chlorella* NC64A (n.i.) und PBCV-1-infizierten *Chlorella* NC64A (15 bis 240 min nach der Infektion) isoliert und mit einem 1,5%igen Agarosegel getrennt. Große (~3,5 kb) und kleine (~1,8 kb) Untereinheiten der cytosolischen rRNA sind angezeigt (Pfeile). (B) Die Gesamt-RNA wurde auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten einzelsträngigen *kcv*-DNA-Sonde hybridisiert. Die Größen der markierten RNA-Banden sind rechts stehend angegeben.

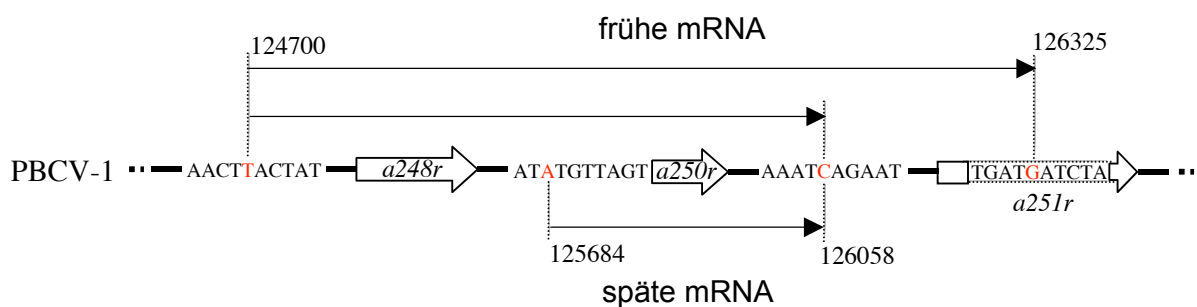
Wie Abb. 4 zeigt hybridisierte die *kcv*-spezifische Sonde mit vier Banden des Northern-*blot*. RNA mit 1,7 kb und 1,4 kb wurde markiert. Auch die Sonde gegen das stromaufwärts gelegene ORF a248r hybridisierte mit einem Transkript der Größe 1,4 kb (Tab. 1). Nach 60 Minuten trat ein großes *kcv*-kodierendes Transkript mit 2,8 kb auf. Die a251r-spezifische Sonde hybridisierte ebenfalls mit einer Bande der Größe 2,8 kb (Tab. 1). Mit der a248r-Sonde war nach 60 Minuten keine RNA dieser Größe markiert worden. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei dieser RNA um eine poly-cistronische RNA handelt, die *kcv* und stromabwärts gelegene Gene kodiert (a251r und a252r, eine Restriktionsendonuklease). Ein spätes Transkript mit ca. 0,3 kb hybridisierte mit der *kcv*-Sonde. Dieses späte Transkript entspricht etwa der Länge des *kcv*-Gens mit 285 Nukleotiden. Die Northern-*blot* Experimente zeigen also, dass *kcv* sowohl in der frühen als auch in der späten Phase des Replikationszyklus von PBCV-1 transkribiert wird.

**Tab. 1:** Hybridisierung von drei spezifischen ssDNA-<sup>32</sup>P-Sonden mit gesamt-RNA aus PBCV-1-infizierter *Chlorella* NC64A. *pks* kodiert eine Proteinkinase, *kcv* einen Kaliumkanal und *M.CviAII* eine DNA-Methyltransferase. Die Größen der radioaktiv markierte RNA-Banden sind nach ihrem Auftreten während der frühen (15-60 min) und der späten (60-240 min) Phase nach der Infektion (p.i.) aufgeführt (n=2).

ORF	RNA-Größen (kb)		
	15-60 min p.i.		
a248r ( <i>pks</i> )	2,8	1,4	1,1
a250r ( <i>kcv</i> )	1,7	1,4	
a251r ( <i>M.CviAII</i> )	2,8	2,3	1,3

### Identifikation und Sequenzierung von *kcv*-mRNA mit der Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)-PCR

Mit Ausnahme der 0,3 kb-RNA waren alle markierten RNA deutlich größer als für das Kcv-Protein mit 94 Aminosäuren Länge zu erwarten. Es könnte sich bei den größeren um polycistronische mRNA handeln. Beispielsweise könnte das 1,4 kb-Transkript *kcv* und eines der flankierenden Gene kodieren. Deshalb habe ich die Initiations- und Terminationsstellen der *kcv* mRNA ermittelt (Abb. 5). Dazu wurde RNA früh (15 min p.i.) und spät (240 min p.i.) aus infizierten Chlorellen isoliert, in cDNA umgeschrieben, am 5'-Ende um einen poly(C)-Schwanz verlängert und mit einem poly(G)-Adapter-Primer und einem genspezifischen Primer nach der 5'-RACE-PCR Prozedur amplifiziert. Für die Transkriptions-Terminationsstellen wurden frühe und späte RNA mit einem poly(T)-Primer in cDNA umgeschrieben und mit einem Adapter-Primer und einem genspezifischen Primer nach der 3'-RACE-PCR Vorschrift amplifiziert.

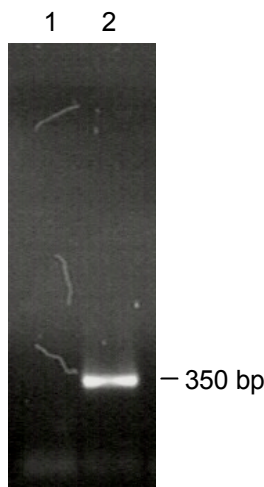


**Abb. 5:** Transkription von *kcv*. Detail aus dem Genom von PBCV-1 mit *kcv* (ORF a250r) und den flankierenden Genen *pks* (ORF a248r) und *M.CviAII* (ORF a251r). Drei Transkripte wurden mit der RACE-PCR identifiziert (Pfeile). Die Transkriptions Start- und Stopstellen sind mit ihren korrespondierenden Positionen auf dem PBCV-1 Genom (gestrichelte Linien) gezeigt. Früh (15 min p.i.) traten zwei bi-cistronische Transkripte auf: 1625 nt (von 124700 bis 126325) und 1358 nt (124700 bis 126058). Spät (240 min p.i.) wurde ein monocistronisches Transkript mit 374 nt identifiziert (125684 bis 126058).

Zwei RNA-Moleküle mit 1358 Nukleotiden und 1625 Nukleotiden wurden aus der RNA-Isolierung 15 min p.i. identifiziert, welche mit den 1,4 kb und 1,7 kb Banden der Northern-Hybridisierung (Abb. 4) übereinstimmen. Bei beiden RNA-Spezies startet die Transkription an der gleichen Stelle (33 Nukleotide stromaufwärts von *p<sub>kx</sub>*) und endet innerhalb von a251r (ein Transkript endet 82 Nukleotide stromabwärts von *kcv*, das andere endet 349 Nukleotide stromabwärts von *kcv*). Beides sind bi-cistronische Transkripte, die *p<sub>kx</sub>* und *kcv* vollständig enthalten. Eine späte RNA mit 374 Nukleotiden Länge wurde identifiziert; diese begann 8 Nukleotide stromaufwärts von *kcv* und endete 82 Nukleotide stromabwärts von *kcv*. Diese RNA stimmte mit der 0,3 kb-Bande aus der Northern-Hybridisierung überein. In Abb. 5 sind die identifizierten *kcv*-Transkripte zusammengestellt: Zwei frühe Transkripte kodieren *p<sub>kx</sub>* zusammen mit *kcv*. Ein spätes Transkript wurde gefunden, welches *kcv* alleine kodiert. 240 Minuten p.i. wurde wie schon in der frühen Probe ein Transkriptionsende 349 Nukleotide stromabwärts vom *kcv*-Gen gefunden. Es fehlte aber eine korrespondierende Startstelle. Die späte 2,8 kb-RNA-Bande, die mit Northern-Hybridisierung sichtbar war, konnte mit der RACE-PCR nicht identifiziert werden.

Im Gegensatz zur oben beschriebenen 5'-RACE-PCR wird mit der RNA-Ligase-vermittelten (RLM)-RACE-PCR nur solche RNA amplifiziert, die ein Methylguanosin-Cap am 5'-Ende trägt. Nur prozessierte mRNA trägt dieses ‚Cap‘ und stellt somit reife mRNA dar. Um zu ermitteln, welche der zuvor gezeigten RNA-Spezies reife mRNA sind, wurde daher gesamt-RNA aus PBCV-1-infizierten Zellen 15 Minuten und 240 Minuten nach der Infektion isoliert. Selektiv wurde nur mRNA mit Cap-Struktur am 5'-Ende mit einem Adapter ligiert und dann mit einem Adapter-Primer und einem *kcv*-spezifischen Primer nach der RLM-RACE PCR-Vorschrift amplifiziert. (Details zu diesem Verfahren sind in Material und Methoden beschrieben).

Nur aus RNA-Proben 240 Minuten p.i. konnte ein PCR-Produkt amplifiziert werden (Abb. 6). Die Startstelle der korrespondierenden RNA stimmt mit der Startstelle überein, die schon bei der kurzen mono-cistronischen RNA identifiziert wurde, 8 Nukleotide stromaufwärts vom Translations-Start von *kcv*.



**Abb. 6:** Reife *kcv* mRNA wird nur in der späten Phase der PBCV-1 Replikation synthetisiert. Agarosegel mit PCR Produkt aus der 5'-RLM-RACE-PCR. RNA von infizierten *Chlorella* NC64A war 15 min p.i. (Spur 1) und 240 min p.i. (Spur 2) isoliert worden. Selektiv wurde nur gecappte mRNA mit einem Adapter ligiert und anschließend mit einem Adapter-Primer und einem *kcv*-spezifischen Primer amplifiziert.

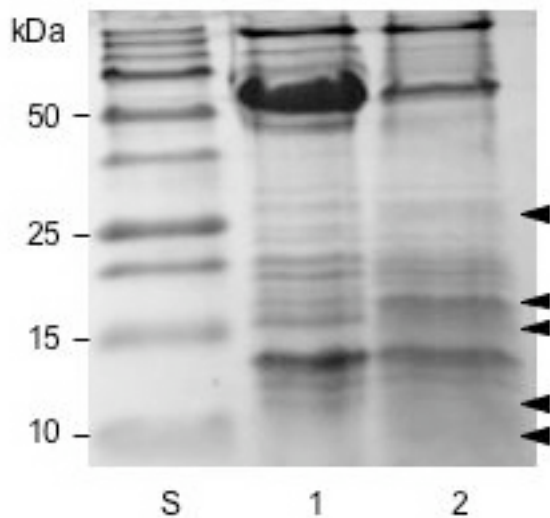
Die Ergebnisse zu den *kcv*-Transkriptionsstudien lassen sich wie folgt zusammen fassen: das Kaliumkanalgen *kcv* wird während des gesamten Replikationszyklus von PBCV-1 transkribiert. In der frühen Replikationsphase wird *kcv* zusammen mit dem stromaufwärts gelegenen Gen einer Proteinkinase (*pkx*) in Form von zwei bi-cistronischen RNA abgelesen. Diese bi-cistronischen RNA tragen kein Methylguanosin-Cap am 5'-Ende, welches prozessierte Vollängen-mRNA auszeichnet. Vermutlich wird aus diesen frühen RNA-Spezies Kcv Protein nicht synthetisiert. In der späten Phase der viralen Replikation wird *kcv* aber als mono-cistronische mRNA mit 5'-Methylguanosin-Cap exprimiert.

### 2.1.2. Versuche zum Nachweis von Kcv Protein im Virion von PBCV-1

Häufig bilden späte virale Gene Strukturproteine von Viruspartikeln. Da *kcv* wie gezeigt spät exprimiert wird und Hinweise auf eine Funktion von Kcv während der Infektion vorliegen (siehe Abschnitt 2.2.), kann vermutet werden, dass Kcv in der inneren Virusmembran reifer PBCV-1-Partikel integriert ist. Da ein spezifischer anti-Kcv-Antikörper für Immunlokalisationsstudien bisher nicht zur Verfügung steht, sollte der Nachweis von Kcv-Protein im Viruspartikel mit massenspektrometrischen Methoden geführt werden. Die Analyse mit der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation Flugzeit-Spektroskopie (MALDI-TOF) bietet die Möglichkeit Peptide auch aus einem Gemisch mehrerer Proteine zu identifizieren.

#### *Untersuchung von hydrophoben Proteinen aus PBCV-1*

Trennt man Gesamtprotein von PBCV-1 mit der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) so kann man etwa 40 Proteinbanden mit Silberfärbung auf dem Gel sichtbar machen. Aus Studien mit radiomarkierten Peptiden waren sogar mehr als 50 Strukturproteine im PBCV-1-Partikeln nachgewiesen worden (Skrdla *et al.* 1984, Van Etten 2003). Um aus diesen Proteinen gegebenenfalls Kcv anzureichern habe ich Peptide für die Analyse in der MALDI-TOF nach den Kriterien Molekularmasse und Hydrophobizität ausgewählt. Die Masse der 94 Aminosäurereste von Kcv wird auf etwa 11 Kilodalton (kDa) berechnet, und das Protein weist als transmembranes Kanalprotein ausgedehnte hydrophobe Bereiche auf. Aus dem Hydrophobizitäts-Profil (nach Kyte und Doolittle 1982) von Kcv lässt sich abschätzen, dass mindestens 60 der 94 Aminosäuren des Kcv-Proteins hydrophobe Bereiche bilden. Daher wurde PBCV-1-Gesamtprotein zunächst solubilisiert und der temperaturinduzierten Triton X-114 Zwei-Phasentrennung unterzogen. Bei dieser Methode trennen sich amphiphile Proteine überwiegend in die Detergensphase und hydrophile Proteine überwiegend in die wässrige Phase des zweiphasigen Systems (Bordier 1981). Beide Fraktionen wurden mit SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt (Abb. 7). Sechs Proteinbanden mit apparenten Molekularmassen von 6 bis 25 kDa, die nur in der Detergensphase vorhanden waren oder die in der Detergensphase stärker als in der wässrigen Phase repräsentiert waren, wurden vom Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF untersucht.



**Abb. 7:** Identifizierung möglicher hydrophober Strukturproteine von PBCV-1. SDS-PAGE (17,5% Poplyacrylamid) von 250 µg PBCV-1 Gesamtprotein nach der Triton X-114 Zwei-Phasentrennung, gefärbt mit Coomassie-Blau. Hydrophile Proteine reichern sich in der wässrigen Phase (1), hydrophobe Proteine überwiegend in der Detergensphase (2) an. Pfeile weisen auf Peptide mit unterschiedlicher Verteilung in den beiden Phasen hin. Links ein Proteinstandard (S) mit molekularen Massen.

Für die MALDI-TOF-Analyse werden Proteine mit Trypsin hydrolysiert. Zunächst an eine Matrix gekoppelt, werden die Peptide dann durch Laserpulse ionisiert und in die Gasphase eines elektromagnetischen Feldes gebracht. Die Massen der entstandenen Fragmente werden mit einem Flugzeitspektrometer bestimmt. Die Massen aus der MALDI-TOF werden dann mit einer Datenbank verglichen und führen bei ausreichenden Übereinstimmungen zur Identifizierung eines Proteins. Tab. 2 listet die Treffer der Datenbanksuche auf, die mit den Proteinproben aus der Triton X-114 Zwei-Phasentrennung erreicht wurden.

**Tab. 2:** Ergebnisse einer Datenbanksuche von Massen aus MALDI-TOF Analysen von PBCV-1-Protein. Proteine aus der Detergensphase einer temperaturinduzierten Triton X-114 Zwei-Phasentrennung mit apparenten Molekularmassen von 8-25 kDa wurde untersucht.

ORF	score	Anzahl übereinstimmender Massen (von gesuchten)	Sequenz- Abdeckung	nominelle Masse [kDa]	SDS-PAGE apparente Masse [kDa]
a253r	88*	7 (20)	42%	19084	17
a211r	48	8 (13)	88%	12151	12
a536l	68*	5 (12)	52%	8480	8

\* bezeichnet signifikante Treffer

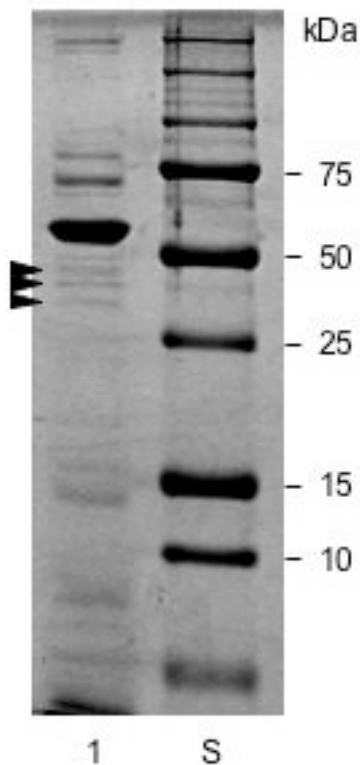
Die Datenbankrecherche mit Mascot Peptid-Fingerprint (Matrix Science) und Profound (Rockefeller Inst.) konnte zwei Proteine aus dem PBCV-1-Genom sicher identifizieren. Ein Treffer gilt als signifikant, wenn der errechnete *score* größer als 64 ist ( $score = -10 \cdot \log(P)$ ;  $P$  ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um einen Zufallstreffer handelt). Die beiden Proteine entsprechen PBCV-1 ORF a253r und ORF a536l, beides sind Proteine mit unbekannter



Funktion. Die Aminosäuresequenz von a253r weist einen hydrophoben Bereich etwa in der Mitte der Sequenz auf. ORF a536l hat N-terminal einen etwa 20 Aminosäuren langen hydrophoben Proteinbereich. Ein weiteres Proteine aus PBCV-1 wurde mit geringerem *score* identifiziert: PBCV-1 ORF a211r, ein Protein, das eine Transmembransequenz enthält; eine Funktion des Proteins ist nicht bekannt. Alle weiteren untersuchten Proteine der Detergensphase erzeugten MALDI-TOF-Spektren mit guten Signalintensitäten aber Datenbankvergleiche lieferten keine signifikanten Übereinstimmungen für die gefundenen Massen. Keine der detektierten Massen war mit Massen eines hypothetische Trypsin-Verdaus von Kcv identisch.

#### *Untersuchung von PBCV-1 Protein mit der Masse des Kcv-Tetramers*

Funktionelle Kaliumkanäle sind Tetramere (Hille 2001, Doyle *et al.* 1998). Die tetramere Struktur von Kaliumkanälen erwies sich als stabil, auch nach der Aufreinigung und in Anwesenheit des Detergens SDS (Heginbotham *et al.* 1997). Auch bei der Expression von Kcv::GFP-Fusionsprotein in Säugerzellen werden in Western-Blot-Analysen mit GFP-spezifischen Antikörpern neben Banden mit der monomeren Masse von Kcv auch Banden mit der Masse des tetrameren Proteins markiert (B. Hertel, C. Pagliuca persönliche Mitteilung). Daher habe ich auch PBCV-1 Proteine von SDS-Gelen extrahiert und mit der MALDI-TOF analysiert, deren apparente Molekularmasse von 42 kDa bis 48 kDa etwa dem Vierfachen der Masse von Kcv entsprechen (Abb. 8).



**Abb. 8:** Coomassie gefärbtes SDS-Gel (12% Polyacrylamid) von PBCV-1 Gesamtprotein. 125 µg Virusprotein (Spur 1) war elektrophoretisch getrennt und drei Banden mit den apparenten Molekularmassen 42, 45 und 48 kDa (Pfeile) vom Gel extrahiert worden (Spur 1). Spur S bezeichnet einen Proteinstandard mit den Molekularmassen (rechts).

Drei PBCV-1 Proteine mit apparenten molekularen Massen 45 und 48 kDa auf einem 12,5% Polyacrylamid SDS-Gel wurden mit der MALDI-TOF Analyse identifiziert (Tab. 3): (i) ORF a488r (34,6 kDa) ein Prolin-, Glycin-reiches Protein, (ii) R.CviAII (39,9 kDa), eine Restriktionsendonuklease und (iii) a111 (45,7 kDa), das hypothetische Protein enthält eine Aminoacyl-tRNA Synthetase Klassen-II.

Zusätzlich wurde MC049L aus Molluscum contagiosum Virus mit 97% (Mascot) bzw. 75% (ProFound) Wahrscheinlichkeit identifiziert, wobei es sich sicher um einen falsch-positiven Befund handelt.

**Tab. 3:** Nachweis von drei Proteinen aus dem PBCV-1 Partikel. Virus-Gesamtprotein war mit SDS-PAGE getrennt und ausgewählte Banden in der MALDI-TOF-Analyse identifiziert worden.

ORF	score	Anzahl übereinstimmender Massen (von gesuchten)	Sequenz- Abdeckung	nominelle Masse [kDa]	SDS-PAGE apparente Masse [kDa]
R.CviAII	100	7 (21)	18%	39,9	45
a558l / a111	100	8 (27)	21%	45,7	48
a488r	71	5 (27)	18%	34,6	48

Die Massen aus allen MALDI-TOF-Spektren wurden ergänzend zu den Datenbankrecherchen noch ‚von Hand‘ nach Übereinstimmungen mit 19 Kcv-Fragmenten eines hypothetischen Trypsin-Verdau durchsucht. Die Masse 742.36283 aus dem MALDI-TOF-Spektrum einer 48 kDa-Bande stimmte (bei einer gegebenen Toleranz) mit der Masse des Kcv-Fragments MLVFSK (742.4062) überein. Die Übereinstimmung eines einzelnen Fragments stellt aber keinesfalls einen verlässlichen Hinweis auf ein Protein dar.

Zusammenfassend konnte also mit der MALDI-TOF-Analyse ausgewählter Strukturproteine aus PBCV-1 das Kcv-Protein nicht nachgewiesen werden.

## 2.2. Das Membranpotential der Wirtszelle *Chlorella* NC64A ändert sich während der Infektion mit PBCV-1

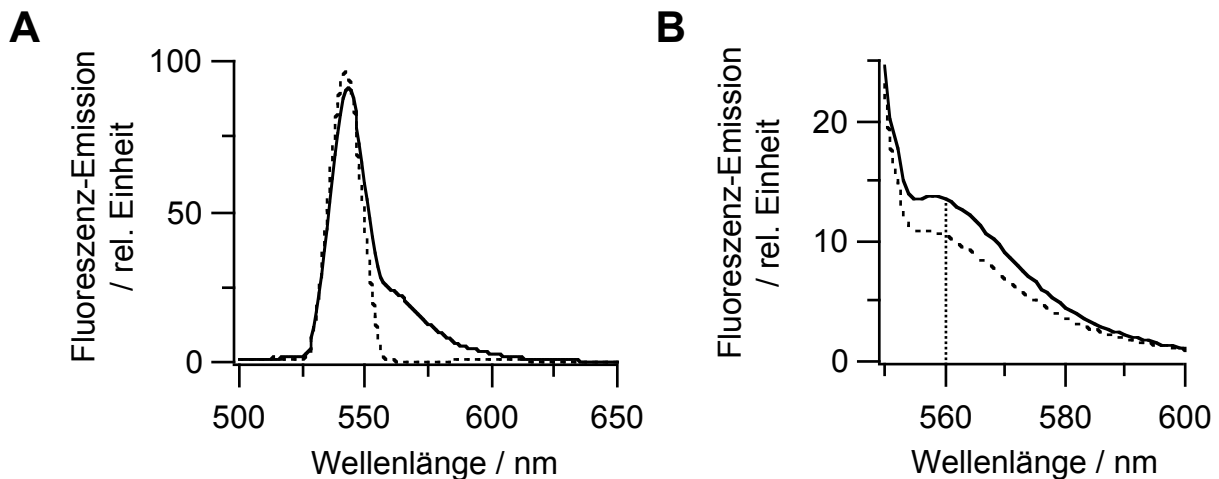
Kcv scheint für die Replikation von PBCV-1 essentiell zu sein, da die Virusreplikation und die Kanalaktivität von Kcv in heterologen Systemen eine ähnliche Pharmakologie aufweisen. Beispielsweise hemmt das Barium-Ion die Kcv-Leitfähigkeit (heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert) in derselben Dosis-Wirkungs-Beziehung wie die Virusreplikation im *plaque*-Test gehemmt wird (Plugge *et al.* 2000). Indirekt weist dies auf einen Wirkort von  $\text{Ba}^{2+}$  außerhalb der Wirtszelle hin, da ein unspezifischer Einstrom von  $\text{Ba}^{2+}$  in *Chlorella*-Zellen nicht ausreicht eine hemmende  $\text{Ba}^{2+}$ -Konzentration von mindestens 1 mM im Cytoplasma zu erreichen. Daraus kann gefolgert werden, dass  $\text{Ba}^{2+}$  die Kcv-Aktivität in einer Phase der Replikation hemmt, in der Kcv dem extrazellulären Medium ausgesetzt ist. Dies ist nur zu verstehen, wenn man annimmt, dass Kcv im Virion vorhanden ist.

Einige Viren verursachen in der frühen Phase der Infektion eine Depolarisation der Wirtszelle (Boulanger und Letellier 1988, Piller *et al.* 1998). Diese Ergebnisse führten zur Entdeckung, dass virale Ionenkanäle in die Plasmamembran des Wirts integriert werden (Carrasco 1995). Daher war die Arbeitshypothese für die Funktionsweise von Kcv, dass auch Kcv als Teil der internen Virusmembran vorhanden ist und während der Fusion von Virus und Wirt in die Plasmamembran des Wirts integriert wird. In diesem Versuchsteil sollte deshalb das Membranpotential von *Chlorella* NC64A während der ersten Minuten der Infektion mit Chlorellaviren gemessen werden.

### *Messung des Membranpotentials von Chlorella-Zellen mit dem spannungsabhängigen Fluoreszenzfarbstoff Bis-Oxonol*

*Chlorella* NC64A-Zellen haben einem Durchmesser von nur etwa 5  $\mu\text{m}$  und verfügen über eine starre Zellwand. Deshalb ist die Messung von elektrischen Ereignissen mit Mikroelektroden bei diesen Zellen kaum durchführbar. Alternativ können Änderungen des Membranpotentials an solchen Zellen mit spannungsabhängigen Fluoreszenzfarbstoffen wie Bis-Oxonol gemessen werden. Dazu wurden Zellsuspensionen mit 1  $\mu\text{M}$  Bis-Oxonol ( $\text{DiSBAC}_2(3)$ ) inkubiert (Abb. 9 A). Der lipophile anionische Farbstoff akkumuliert im Cytoplasma depolarisierter Zellen und bindet dort an zelluläre Membrane und Proteine, wobei es zu einem Anstieg der Fluoreszenz kommt (Epps *et al.* 1994). Dadurch erzeugt die Verschiebung des Membranpotentials zu positiveren Werten eine Zunahme der Fluoreszenz von Bis-Oxonol.

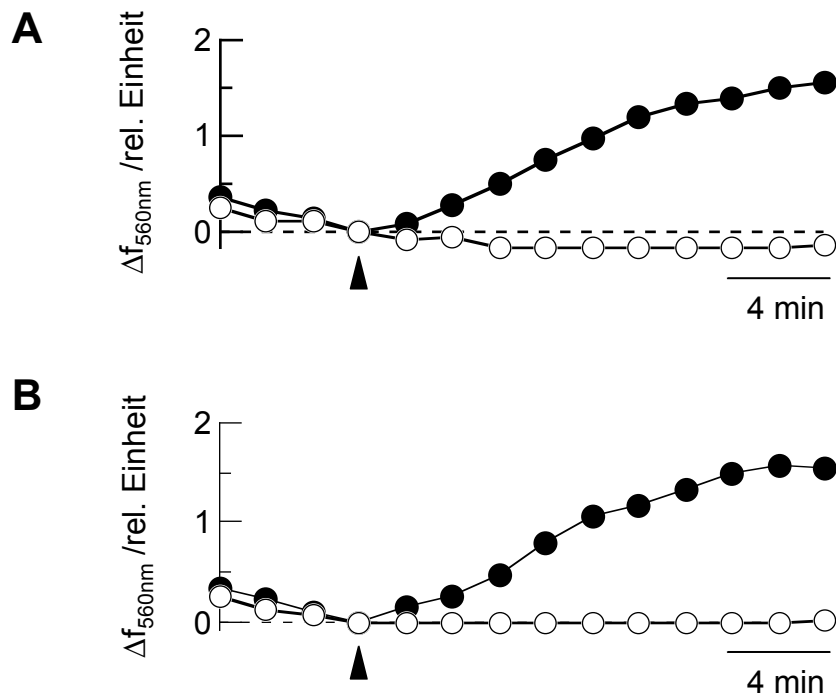
Um die Sensitivität von Bis-Oxonol gegenüber Spannungsänderungen in *Chlorella* zu testen, wurden die Zellen mit dem Ionophor Nystatin behandelt. In der verwandten Art *Chlorella vulgaris* war bei derselben Behandlung eine Verschiebung des Membranpotentials von  $-135$  mV nach  $-20$  mV beobachtet worden (Komor und Tanner 1967). Abb. 9 B zeigt die Emissionsspektren von Bis-Oxonol in *Chlorella* NC64A vor und 10 min nach der Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Nystatin. Bei der Referenz-Wellenlänge 560 nm stieg die Fluoreszenz-Emission nach Nystatin-Zugabe um  $30,7 \pm 3\%$ . Nach der zuvor genannten Untersuchung von Komor und Tanner (1967) korrespondiert dies mit einer Depolarisation um etwa 100 mV. Bis-Oxonol ist somit ein geeigneter Farbstoff um Änderungen des Membranpotentials bei *Chlorella* NC64A zu verfolgen.



**Abb. 9:** Messung des Membranpotentials von *Chlorella* NC64A mit dem spannungsabhängigen Fluoreszenzfarbstoff Bis-Oxonol. (A) Emissionsspektrum von *Chlorella* NC64A ( $3,5 \times 10^6$  Zellen·ml<sup>-1</sup>) ohne Bis-Oxonol (gestrichelte Linie) und mit 1  $\mu$ M Bis-Oxonol (durchgezogene Linie). Die Fluoreszenz wurde bei  $540 \pm 5$  nm angeregt. (B) Effekt des Ionophors Nystatin auf die Bis-Oxonol-Fluoreszenz in *Chlorella* NC64A. Die Emissionsspektren vor der Zugabe (gestrichelte Linie) und 10 min nach der Zugabe von 50  $\mu$ M Nystatin (durchgezogene Linie) sind gezeigt. Bei der Referenz-Wellenlänge 560 nm (gestrichelte Senkrechte) führte die Behandlung mit Nystatin nach 10 min zu einem Anstieg der Fluoreszenz um etwa 30%.

#### *PBCV-1 induzierte eine wirtsspezifische Depolarisation*

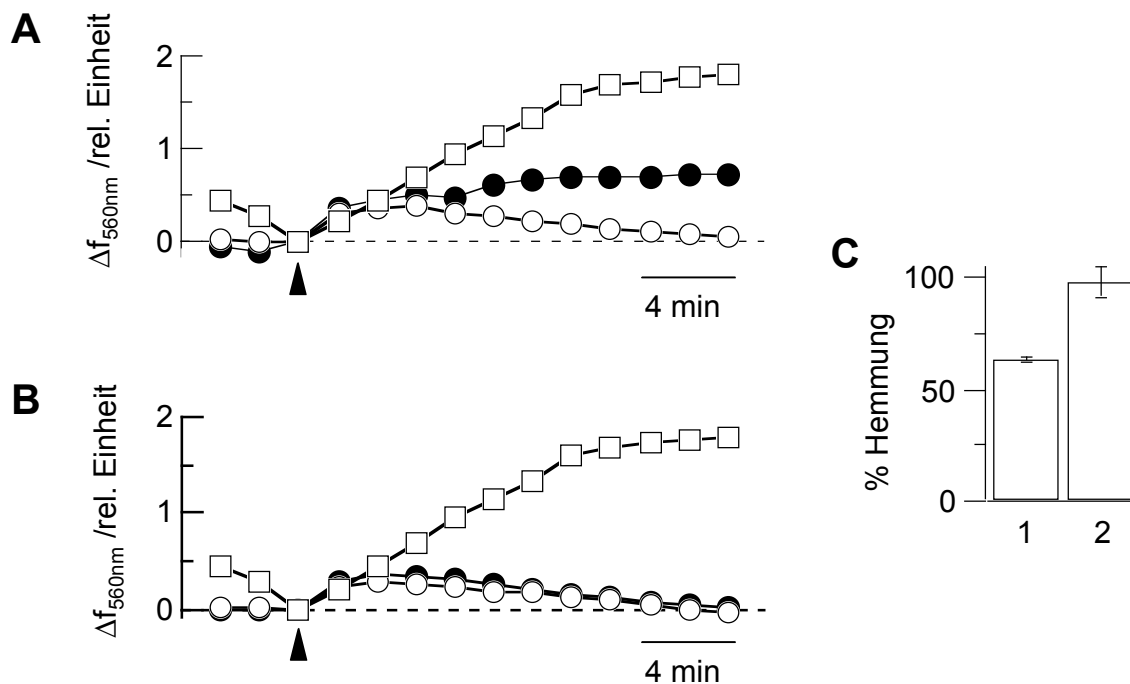
Um den Effekt der viralen Infektion auf das Membranpotential der Wirtszelle zu untersuchen, wurde die Änderung der Bis-Oxonol Fluoreszenz in *Chlorella* vor und nach der Zugabe von PBCV-1 gemessen.  $3,5 \times 10^6$  Zellen·ml<sup>-1</sup> *Chlorella* NC64A wurden mit 1  $\mu$ M Bis-Oxonol inkubiert, nach 6-8 Minuten stellte sich ein Gleichgewicht der Fluoreszenzemission, gemessen bei 560 nm, ein. Nach der Zugabe von PBCV-1 in einem Virus zu Wirts-Verhältnis (*multiplicity of infection*, m.o.i.) von 10:1 stieg die Fluoreszenzemission etwa 15 Minuten lang an bis zu einem neuen Gleichgewicht. Ohne Zugabe von PBCV-1 blieb eine solche Depolarisation aus (Abb. 10 A). Anders als *Chlorella* NC64A wird *Chlorella vulgaris* nicht von PBCV-1 infiziert. Wurden  $3,5 \times 10^6$  Zellen·ml<sup>-1</sup> *Chlorella vulgaris* mit PBCV-1 inkubiert, dann blieb in diesen Versuchen eine Änderung der Bis-Oxonol Fluoreszenz aus (Abb. 10 B). Daraus lässt sich ableiten, dass die Depolarisation wie die Infektion wirtsspezifisch ist.



**Abb. 10:** Effekt von PBCV-1 auf das Membranpotential von *Chlorella*-Zellen. Die Änderung der Fluoreszenz ( $\Delta f_{560nm}$ ) wurde nach der Zugabe von PBCV-1 (Pfeile) über 20 min in Abständen von 2 min gemessen; die Fluoreszenz bei Viruszugabe wurde gleich Null gesetzt. **(A)** *Chlorella* NC64A ohne PBCV-1 (○) und mit PBCV-1 (●). In **(B)** wurde PBCV-1 zu *Chlorella vulgaris* (○) oder *Chlorella* NC64A (●) gegeben.

#### *Die Depolarisation der Wirtszell Plasmamembran erfordert eine intakte innere Membran des Virus*

PBCV-1 enthält eine innere Membran, die unterhalb des Capsids liegt und den Nukleoproteinkern umspannt. Es ist bekannt, dass organische Lösemittel diese innere Virusmembran zerstören und damit die Infektiosität des Virus hemmen (Skrdla *et al.* 1984). Um die Hypothese zu überprüfen, dass Kcv mit der Virusmembran assoziiert ist wurde PBCV-1 für 5 Tage mit Toluol oder Chloroform unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach wurde die virushaltige Phase des jeweiligen Gemischs abgenommen und in den Experimenten zum Infizieren verwendet. *Chlorella* NC64A wurde mit behandelten und unbehandelten Viren infiziert und die Änderung der Bis-Oxonol Fluoreszenz gemessen (Abb. 11). Als Kontrolle dienten Pufferlösungen, die wie das Virus mit Chloroform oder Toluol behandelt waren.



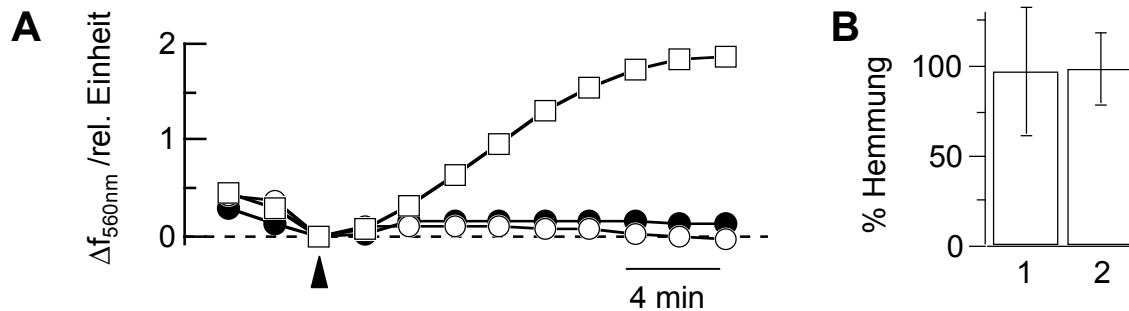
**Abb. 11:** Einfluss einer Behandlung von PBCV-1 mit organischen Lösemitteln auf die virusinduzierte Depolarisation. **(A)** *Chlorella* NC64A wurde mit unbehandeltem PBCV-1 ( $\square$ ), Toluol behandeltem PBCV-1 ( $\bullet$ ) oder mit Toluol behandeltem Puffer ( $\circ$ ) inkubiert. Ebenso wurden Chloroform behandelte Viren getestet **(B)**: PBCV-1 unbehandelt ( $\square$ ), PBCV-1 Chloroform behandelt ( $\bullet$ ) und Puffer Chloroform behandelt ( $\circ$ ). Die Werte zum Zeitpunkt der Viruszugabe (Pfeile) wurden gleich Null gesetzt. **(C)** Relative Hemmung der virusinduzierten Depolarisation  $\pm$  S.D. nach Behandlung mit (1) Toluol ( $n=4$ ) und (2) Chloroform ( $n=5$ ), gemessen 20 min nach der Viruszugabe.

Die Toluol- oder Chloroform behandelten Pufferlösungen hatten keinen Einfluss auf die Fluoreszenzemission von Bis-Oxonol in *Chlorella* NC64A (Abb. 11 A, B). Damit war sichergestellt, dass Spuren der organischen Lösemittel die Zellen und deren Membranpotential nicht beeinflussen. Abb. 11 B, C zeigt, dass die Vorbehandlung von PBCV-1 mit Chloroform zur vollständigen Hemmung der Depolarisation durch das Virus führt: *Chlorella* NC64A-Zellen zeigten nach der Zugabe von Chloroform-behandeltem PBCV-1 keinen signifikanten Anstieg in der Fluoreszenzemission von Bis-Oxonol ( $n=5$ ). Auch die Vorbehandlung von PBCV-1 mit Toluol führte zu einer Hemmung der Fluoreszenzemission (Abb. 11 A, C). Die Hemmung durch Toluol betrug gegenüber unbehandelten Viren  $64 \pm 1,4\%$  ( $n=4$ ).

#### *Der Kaliumkanal-Blocker Barium hemmt die PBCV-1-induzierte Depolarisation*

Wie oben beschrieben hemmen Kaliumkanalinhibitoren wie  $Ba^{2+}$  sowohl die Aktivität von Kcv in heterologen Expressionssystemen als auch die Replikation von PBCV-1 in plaque-Tests. Daher wurde hier auch der Einfluss von  $Ba^{2+}$  auf die PBCV-1-induzierte Fluoreszenzemission untersucht, um zu prüfen ob sich die  $Ba^{2+}$ -Empfindlichkeit auch bei der Virus-induzierten Depolarisation während der Infektion zeigt. Dem Testansatz wurden 10

mM oder 20 mM BaCl<sub>2</sub> zugesetzt - Konzentrationen, bei denen die Kcv-Aktivität in *Xenopus* Oozyten vollständig gehemmt wird (Plugge *et al.* 2000). Abb. 12 zeigt den Effekt von BaCl<sub>2</sub> auf die Bis-Oxonol-Fluoreszenz in PBCV-1-infizierten *Chlorella* NC64A.



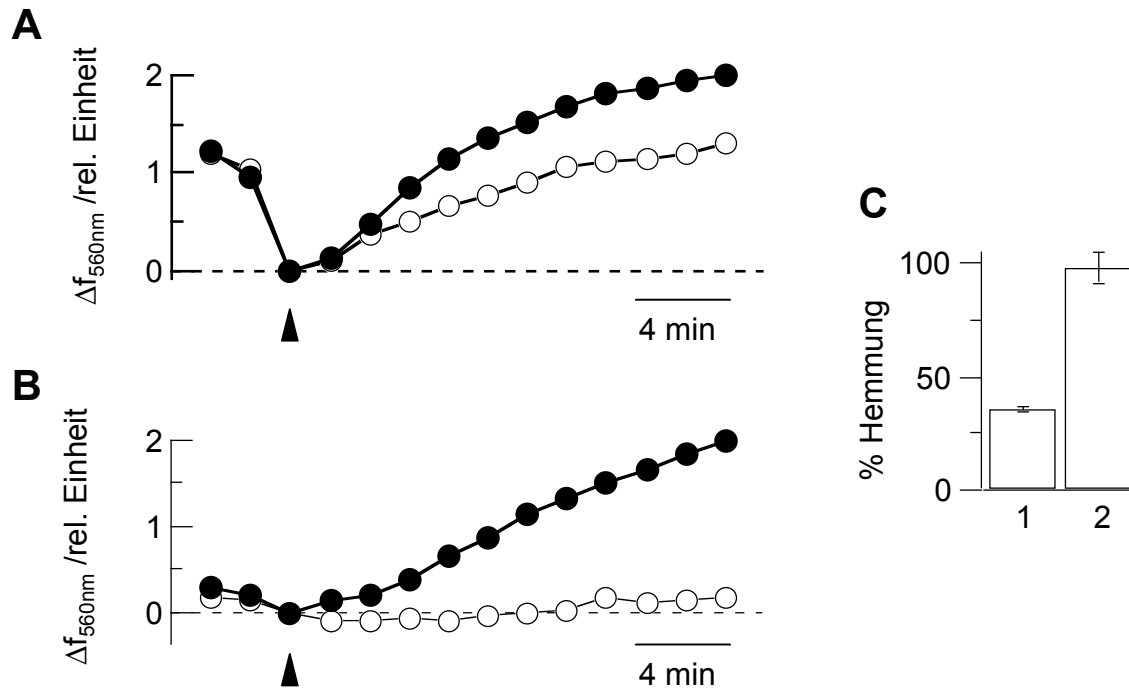
**Abb. 12:** Einfluss von Ba<sup>2+</sup> auf die PBCV-1-induzierte Depolarisation von *Chlorella* NC64A-Zellen. **(A)** Änderung der Bis-Oxonol Fluoreszenz nach Zugabe von PBCV-1 ohne (□) und mit 10 mM BaCl<sub>2</sub> (●) oder 20 mM BaCl<sub>2</sub> (○) im Medium. Die Werte zum Zeitpunkt der Viruszugabe (Pfeil) wurden genullt. **(B)** Relative Hemmung der Depolarisation ± S.D. mit 10 mM BaCl<sub>2</sub> (1) und 20 mM BaCl<sub>2</sub> (2) 20 min nach der Viruszugabe (n=10).

Wie Abb. 12 zeigt führten die getesteten BaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen bei je 10 unabhängigen Versuchen im Durchschnitt zu einer vollständigen Hemmung der PBCV-1-induzierten Änderung der Bis-Oxonol Fluoreszenz. Mit 10 mM BaCl<sub>2</sub> betrug die Hemmung gegenüber Kontrollmessungen ohne BaCl<sub>2</sub> 97 ± 36%. Bei 20 mM BaCl<sub>2</sub> war die relative Hemmung 98 ± 20% (Abb. 12 B).

#### *Verschiedene Chlorellavirus-Varianten zeigen unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Cäsium*

Sechs Homologe des Kcv Proteins aus verschiedenen Chlorellavirus-Varianten wurden bis heute charakterisiert (Kang *et al.* 2004). Alle haben eine Länge von 94 Aminosäuren und unterscheiden sich maximal in 14 Aminosäureresten untereinander. Trotz der geringen Abweichungen ihrer Aminosäuresequenzen zeigen diese Kanäle in *Xenopus* Oozyten deutliche Unterschiede ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften. Bemerkenswert ist dabei u.a. eine sehr unterschiedliche Empfindlichkeit der Kcv-Homologe gegenüber dem Kaliumkanalhemmstoff Cäsium. So wird die K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit des Kcv-Homologs aus dem Virusstamm NY-2A in *Xenopus* Oozyten von 3 mM CsCl um mehr als 90% inhibiert. Im Gegensatz dazu wird die K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit von Kcv aus PBCV-1 unter denselben Bedingungen nur um etwa 30% inhibiert. Eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber Cs<sup>+</sup> zeigt auch die Replikation der Viren in plaque-Tests: Die Replikation von NY-2A ist in Gegenwart von 3 mM CsCl um >90% inhibiert. Die Replikation von PBCV-1 wird dagegen in Anwesenheit von 10 mM CsCl nicht sichtbar inhibiert (Plugge *et al.* 2000, Kang *et al.* 2004). Sollten die beobachteten Effekte auf einer Hemmung der viralen Kaliumkanäle während der Infektion beruhen, dann wäre zu erwarten, dass Cs<sup>+</sup> bei den unterschiedlichen Viren unterschiedliche Effekte auch auf die Depolarisation zeigt. In den folgenden Versuchen habe ich deshalb den

Einfluss von  $\text{Cs}^+$  auf die Änderung des Membranpotentials von *Chlorella* NC64A bei der Infektion mit den Virusstämmen NY-2A und PBCV-1 untersucht. Dazu wurden  $3,5 \times 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  *Chlorella* NC64A mit den zwei unterschiedlichen Viren bei der gleichen m.o.i. von 20 infiziert und die Depolarisation der Zellen in Abhängigkeit von  $\text{Cs}^+$  gemessen (Abb. 13).



**Abb. 13:** Effekt von  $\text{Cs}^+$  auf die Virus-induzierte Depolarisation von *Chlorella* NC64A mit zwei verschiedenen Chlorellavirus Stämmen. (A) Änderung der Bis-Oxonol Fluoreszenz ( $\Delta f_{560\text{nm}}$ ) nach Zugabe von PBCV-1 ohne  $\text{CsCl}$  (●) und mit 10 mM  $\text{CsCl}$  (○) im Testansatz. (B) Fluoreszenzänderung nach Zugabe von NY-2A ohne  $\text{CsCl}$  (●) und mit 10 mM  $\text{CsCl}$  (○). Die Werte zum Zeitpunkt der Viruszugabe (Pfeile) wurden gleich Null gesetzt. (C) Relative Hemmung der Depolarisation  $\pm$  S.D. durch 10 mM  $\text{CsCl}$  in (1) PBCV-1 und (2) NY-2A ( $n=4$ ), gemessen 20 min nach der Viruszugabe.

Die Hemmung der virusinduzierten Depolarisation durch  $\text{CsCl}$  im Testansatz war deutlich unterschiedlich bei den beiden Virusstämmen PBCV-1 und NY-2A. 1 mM  $\text{CsCl}$  zeigte bei PBCV-1 20 min p.i.  $9 \pm 9\%$  Hemmung. Mit 10 mM  $\text{CsCl}$  betrug die Hemmung 20 min p.i.  $36 \pm 3\%$  (Abb. 12 A, C). Dagegen war die Depolarisation durch NY-2A deutlich  $\text{Cs}^+$ -sensitiver: bei 1 mM  $\text{CsCl}$  betrug die Hemmung  $21 \pm 3\%$ , bei 10 mM  $\text{CsCl}$   $97 \pm 3\%$  (Abb. 13 B, C).

Die Ergebnisse zur fluoreszenzoptischen Messung des Membranpotentials während der Infektion mit PBCV-1 können wie folgt zusammen gefasst werden: Die Infektion mit Chlorellaviren führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials der Wirtszelle *Chlorella* NC64A. Diese Depolarisation wird durch Kaliumkanalhemmstoffe wie  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Cs}^+$  inhibiert. Dabei ist die Hemmung mit  $\text{Cs}^+$  beim Virus NY-2A, dessen Genom einen  $\text{Cs}^+$ -sensitiven Kaliumkanal kodiert deutlich höher als bei PBCV-1, dessen Kaliumkanalprotein kaum  $\text{Cs}^+$ -sensitiv ist. Die Depolarisation durch PBCV-1 wird auch gehemmt, wenn das Virus zuvor mit organischen Lösemitteln behandelt wurde, welche die interne Virusmembran zerstören.



### 2.3. Sind virale Kaliumkanäle einzigartig für Chlorellaviren? Nachweis der Funktion eines Kaliumkanals aus *Ectocarpus siliculosus* Virus EsV-1

Kcv ist das erste Beispiel eines viruskodierten Kaliumkanals. Wie weiter oben beschrieben wurde gibt es Hinweise darauf, dass Kcv essentiell für die Vermehrung von PBCV-1 in *Chlorella* NC64A ist. Die Bedeutung von Kcv wird weiter dadurch unterstrichen, dass alle untersuchten *Chlorella* NC64A-Viren ein Kcv-Homolog kodieren. Das Chlorellavirus-System ist allerdings in vielerlei Hinsicht besonders. So infiziert das Virus beispielsweise einen *Chlorella*-Stamm, welcher in der Natur nur als Endosymbiont von Ciliaten vorkommt. Man kann also fragen ob virale Kaliumkanäle nur für dieses besondere System eine Rolle spielen oder ob auch andere Viren funktionelle Kaliumkanäle für ihre Replikation benötigen.

#### 2.3.1 *Ectocarpus siliculosus* Virus EsV-1 kodiert ein Kaliumkanal-ähnliches Protein

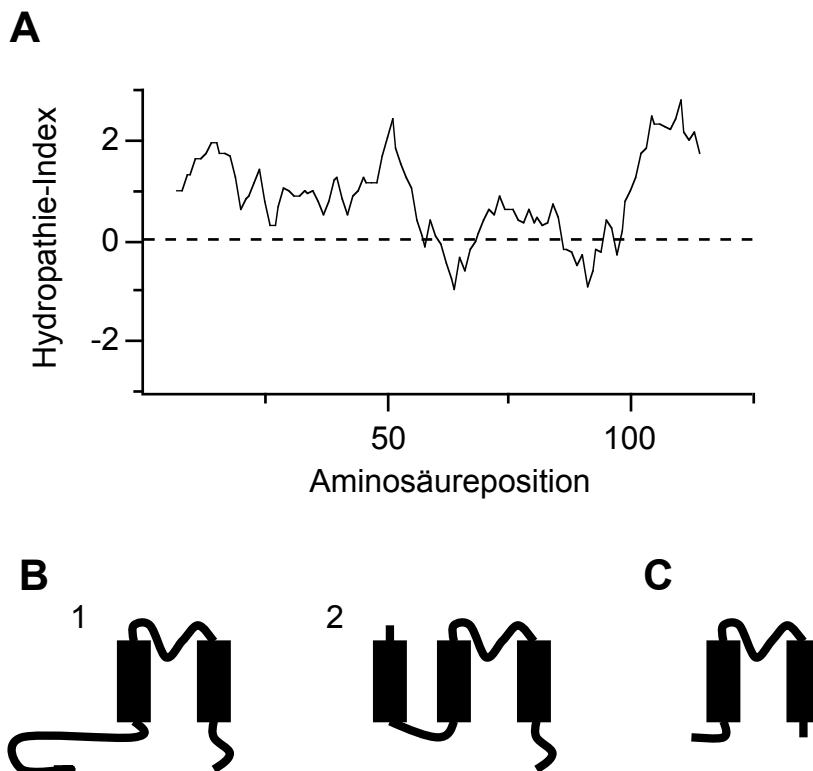
Im Genom des *Ectocarpus siliculosus* Virus (EsV-1) wurde ein kurzes offenes Leseraster (ORF 223) identifiziert, welches ein mögliches Kaliumkanalgen kodiert (Delaroque *et al.* 2001). EsV-1 gehört wie PBCV-1 der Familie *Phycodnaviridae* an. Mit den Chlorellaviren hat das Ectocarpusvirus z.B. ein großes doppelsträngiges DNA-Genom (>300 kb) und eine eikosaedrische Struktur gemeinsam. Anders als PBCV-1 (Gattung *Chlorovirus*) wird EsV-1 der Gattung *Pheovirus* zugeordnet (Kapp 1998). Besonders in ihren Replikationszyklen unterscheiden sich beide Viren erheblich: während PBCV-1 die einzellige Grünalge *Chlorella* NC64A befällt, infiziert EsV-1 nur die Zellwand-losen Gameten und Sporen der fädigen Braunalge *Ectocarpus siliculosus*. Die Unterschiede beider Viren sind eindrucksvoll auf der molekularen Ebene repräsentiert: von jeweils rund 250 proteinkodierenden Genen haben EsV-1 und PBCV-1 nur 10% gemeinsam (Van Etten *et al.* 2002). Darunter sind die Kaliumkanäle Kcv (aus PBCV-1) und das genannte ORF 223 aus EsV-1, das einen möglichen Kaliumkanal kodiert. Das abgeleitete Protein wird im weiteren Kev genannt (für Kaliumkanal Ectocarpusvirus). Das 375 Nukleotide lange ORF kodiert 124 Aminosäuren mit einem Aminosäure-Motiv TSSSVGYG, welches der Kaliumkanal *signature-sequence* TxxTxGYG entspricht (Abb. 14). In allen bekannten Kaliumkanälen bildet ein Tertamer dieses Motivs die K<sup>+</sup>-selektive Pore, den sogenannten Selektivitäts-Filter. Abweichungen von der konservierten Sequenz TxxTxGYG in einzelnen Aminosäuren kommen vor (s. Abb. 14). So zeigt Kev, wie die Kaliumkanäle Eag aus *Drosophila melanogaster* und HERG aus *Homo sapiens*, an der vierten Position der *signature-sequence* einen Austausch von Threonin (T) mit Serin (S).

Für die Funktionalität von Kev sprechen außerdem Vorhersagen über die Topologie des putativen Kaliumkanals. Ein Hydrophobizitäts-Profil von Kev mit dem Kyte-Doolittle-Algorithmus (Abb. 15 A) weist für das Protein drei hydrophobe Bereiche auf, welche Transmembrandomänen darstellen könnten. Für die Kev-Aminosäuresequenz wird mit Datenbank gestützten Vorhersagen (TMpred) oder Topologie-Algorithmen (TMHMM2.0) ebenfalls ein Protein mit zwei, bzw. drei transmembranen Helices berechnet (Abb. 15). Die Wahrscheinlichkeit für die dritte, N-terminale Transmembranhelix (Abb. 15 B2) ist dabei jedoch immer gering. Bei den genannten Vorhersagen liegt die mögliche Porenregion (Position D60 bis L92) des Kanalproteins zwischen zwei hydrophoben, transmembranen Domänen.

## 2. Ergebnisse

AKT1	LWMRYVTSMYWSITTLTTVGYGDLHPVNTKEMIFDIFYM
KAT1	LWNRYVTALYWSITTLTTTGYGDFHAENPREMLFDIFFM
PAK1	LYTKYFNSLYWITITTSMTVGYGDIVPVTTPKILVTVIT
mSlo	QALTYWECVYLLMVTMTSTVGYGDVYAKTTLGRLFMVFFI
shaker	FFKSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMTPVGWVGKIVGSLCA
Kv1.1	HFSSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMYPVTIGGKIVGSLCA
Kv3.1	HFKNIPIGFWWAVVTMTTLGYGDMYPQTWSGMLVGALCA
Kv10.1	DFTSIPAACWWVVISMTTVGYGDMYPITVPGRILGGVCV
KcsA	QLITYPRALWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRLVAVVVM
KirBac1.1	SPPGFVGAFFFSVETLATVGYGDMHPQTVYAHAIATLEI
Kir1.1	NINGLTSAFLFSLETQVTIGYGFRVCVTEQCATAIFLLIF
Kir3.1	NVYNFPSAFLFFIETEATIGYGYRYITDKCEGIILFLF
TREK-1	EGWSALDAIYFVVITLTTIGFGDYVAGGSDIEYLDIFYKP
TOK1	ENWSYFNCIYFCFLCLLTIGYGDYAPRTGAGRAFFVIWA
Eag	RKSMYVTALYFTTMCMTSVGFGNVAAETDNEKVFTICMM
HERG	IKDKYVTALYFTFSSLTSVGFGENVPNTNSEKIFSICVM
<b>Kcv</b>	KKASWIDCIYFGVTT <b>THSTVGF</b> GDILPKTTGAKLCTIAHI
<b>Kev</b>	GFSSAIDAYYFSAVTSSSVGYGDLLPKTPKAKLLTIAHL

**Abb.14:** Die Porenregion von 15 Kaliumkanälen und die putative Pore von Kev. Die Beispiele der Sequenzen sind Vertreter verschiedener Kaliumkanalfamilien. Der Rahmen zeigt die Kaliumkanal *signature-sequence* am Beispiel von Kcv (Plugge *et al.* 2000). Die Kanalsequenzen stammen aus *Arabidopsis thaliana* (AKT1 und KAT1), *Paramecium tetraurelia* (PAK1), Maus (mSlo), *Drosophila melanogaster* (shaker, Eag), Mensch (Kv1.1, Kv3.1, Kv10.1, Kir1.1, Kir3.1, TREK-1, HERG), *Streptomyces lividans* (KcsA), *Burkholderia pseudomallei* (KirBac1.1), *Saccharomyces cerevisiae* (TOK1), PBCV-1 (Kcv) und EsV-1 (Kev).



**Abb. 15 :** Modellierung der Struktur von Kev. (A) Profil der Hydrophatie in der Aminosäuresequenz von Kev. Mit dem Kyte-Doolittle-Algorithmus (Fensterweite 13 Aminosäuren) werden ausgedehnte hydrophobe Bereiche (Werte >0) sichtbar. (B) Zwei alternative Topologie-Modelle von Kev mit zwei Transmembrandomänen (1) oder mit drei Transmembrandomänen (2). (C) Modell von Kcv aus PBCV-1, dem bisher kleinsten funktionalen Kaliumkanal. Balken bezeichnen Transmembranhelices. Geschwungene Linien symbolisieren (oben) extrazelluläre und (unten) cytoplasmatische Schleifen.

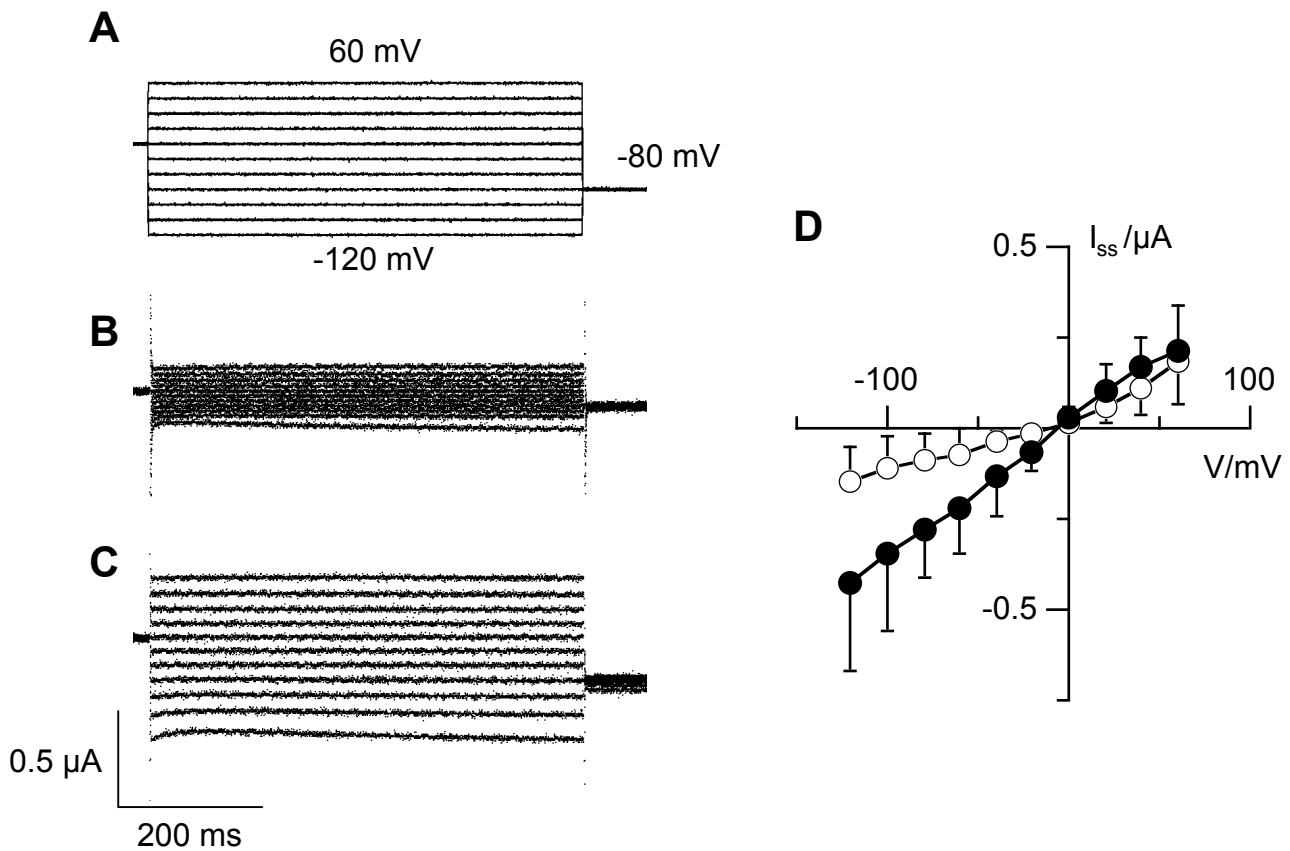
### 2.3.2. *Heterologe Expression von Kev*

Die Überprüfung der Funktionalität eines Kanalproteins kann in heterologen Expressionssystemen geschehen. Dazu wird RNA oder DNA, die das zu testende Protein kodieren, in *Xenopus laevis* Oozyten oder Säugerzellen gebracht und die Änderung der elektrischen Leitfähigkeit in den exprimierenden Zellen gemessen. Genprodukte von Viren aus zahlreichen Virusfamilien (z.B. *Picornaviridae*, *Retroviridae*, *Orthomyxoviridae* oder *Phycodnaviridae*) induzieren in heterologen Expressionssystemen eine erhöhte Membranpermeabilität. Sie werden unter dem Begriff Viroporine zusammengefasst (Gonzales und Carrasco 2003). Der Nachweis einer Aktivität von Viroporinen in heterologen Expressionssystemen wird häufig erschwert durch das Fehlen diskreter Eigenschaften wie Ionen-Selektivität oder die Aktivierung durch physikalische oder chemische Signale (*gating*). Zusätzlich wurde die Aufregulation zelleigener Leitfähigkeiten in heterologen Systemen als Antwort auf die Expression von Viroporinen beobachtet (Kelly *et al.* 2003, Coady *et al.* 1998, Shimbo *et al.* 1995).

Im Gegensatz zu anderen Viroporinen ist mit Kev aufgrund der oben gezeigten Ähnlichkeiten zu Kcv und anderen Kaliumkanälen eine Aktivität mit Kaliumkanal-typischen Eigenschaften zu erwarten. Deshalb wurde bei der heterologen Expression von Kev besonders die K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit von Kev-exprimierenden Zellen geprüft. Zur Beurteilung, ob es sich bei induzierten Leitfähigkeiten um die Aktivität eines Kaliumkanals handelt, werden in dieser Arbeit vier Kriterien herangezogen: (i) K<sup>+</sup>-Selektivität gegenüber anderen Kationen, besonders Na<sup>+</sup>, (ii) Empfindlichkeit gegenüber Kaliumkanalinhibitoren wie Ba<sup>2+</sup>, (iii) Spannungsabhängigkeit und (iv) Kinetik der induzierten Ströme.

#### *Expression von Kev in Oozyten von Xenopus laevis*

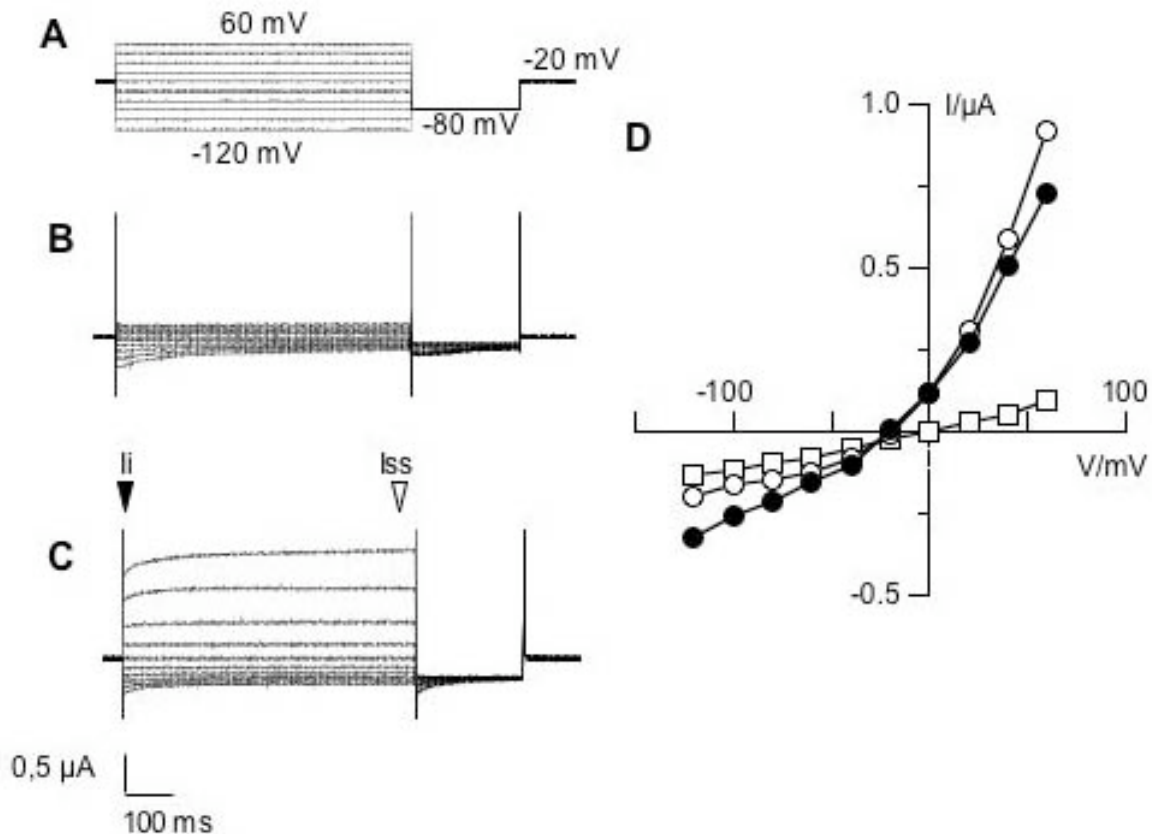
*Xenopus* Oozyten der Stadien IV-V sind ein geeignetes System für die Expression fremder Kanalproteine, da sie eine geringe endogene Leitfähigkeit aufweisen und Fremdgene in der Regel gut exprimieren. Diese Eigenschaften ermöglichen es besonders Kaliumkanäle vor einem geringen Hintergrundstrom zu messen. 50 ng Kev-cRNA aus einer *in-vitro*-Transkription wurde in Oozyten injiziert und die Leitfähigkeit nach 2-3 Tagen mit der Methode der Zwei-Elektroden *voltage-clamp* gemessen. Zur Messung wurden Spannungsprotokolle benutzt, die Oozyten ausgehend von einer Haltespannung -20 mV auf Spannungen von -120 mV bis 60 mV klemmen. Die anliegenden Spannungen und die resultierenden Ströme wurden gleichzeitig aufgezeichnet (Abb. 16).



**Abb. 16:** Die Expression von Kev führt zu erhöhter Leitfähigkeit in *Xenopus laevis* Oozyten. Mit der Zwei-Elektroden *voltage-clamp* Technik wurde die Stromantwort bei Spannungspulsen von -120 bis 60 mV (A) gemessen. Stromantwort einer Wasser-injizierten Kontrollzelle (B) und einer Zelle nach der Injektion von Kev-cRNA (C). (D) Strom-Spannungs-Beziehung stationärer Ströme von Oozyten, die mit Wasser (○) oder Kev-cRNA (●) injiziert wurden ( $n=6$ ;  $\pm$  S.D.).

Aus 45 gemessenen Oozyten war bei 9 Oozyten eine erhöhte Leitfähigkeit gegenüber Wasser-injizierten Kontrollen ( $n=15$ ) zu messen. Die Stromantwort dieser Zellen zeigte sehr variable Amplituden und lineare Strom-Spannungs-Beziehungen (Abb. 16). Eine  $K^+$ -Selektivität war nicht gegeben.

Nur bei Oozyten aus einem einzelnen *Xenopus laevis* Exemplar führte die Injektion von cRNA zur Erhöhung einer  $K^+$ -Leitfähigkeit. 18 cRNA-injizierte Oozyten waren untersucht worden, dabei kam es in 5 Oozyten aus diesem Frosch zu einer deutlichen Leitfähigkeitsänderung (Abb. 17) im Vergleich zu den Wasser-injizierten Kontrollen ( $n=11$ ).



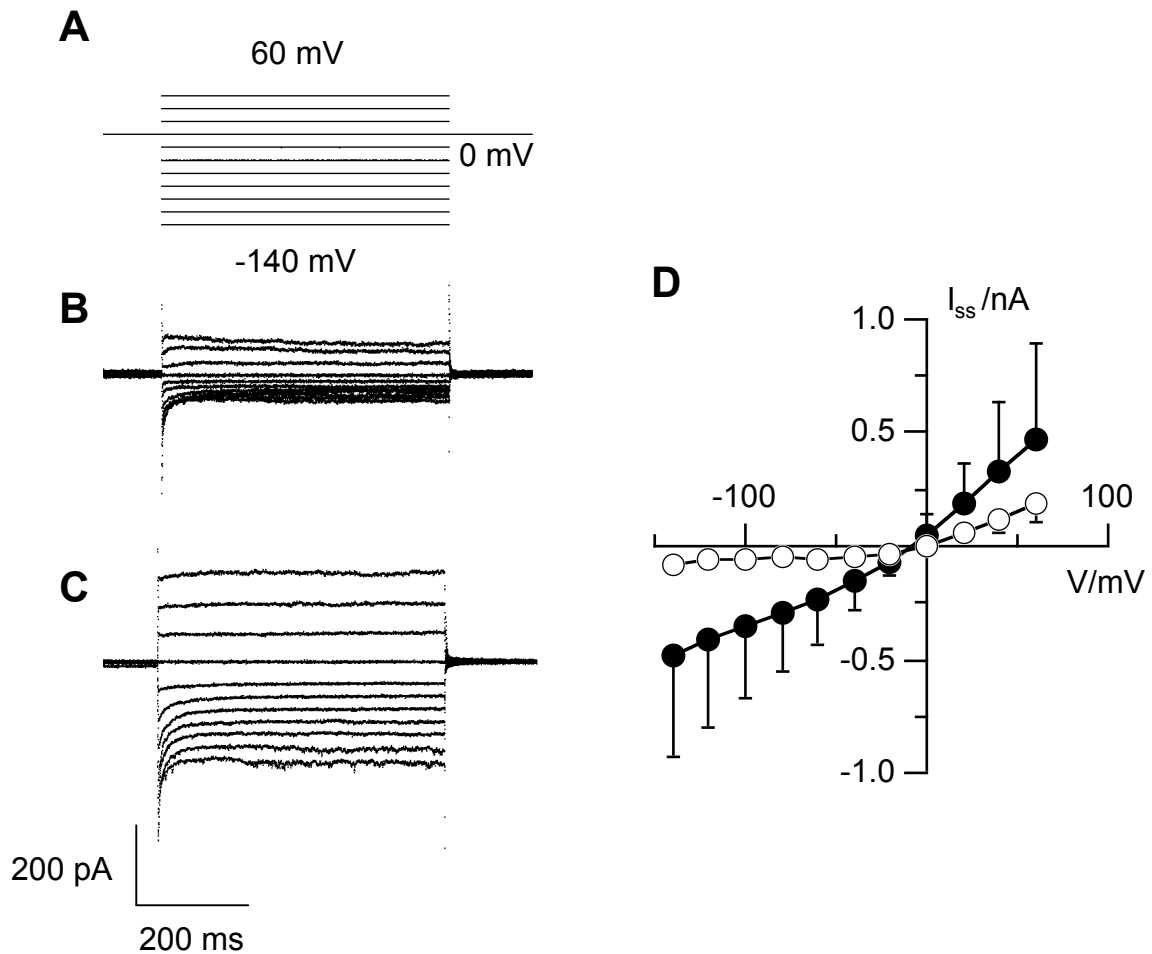
**Abb. 17:** Effekt von Kev-cRNA auf die Leitfähigkeit von Oozyten eines einzelnen *Xenopus laevis* Exemplars. Mit Zwei-Elektroden *voltage-clamp* wurde die Stromantwort bei Spannungspulsen von -120 bis 60mV (A) gemessen. Die Leitfähigkeit war in cRNA-injizierten Oozyten (C) deutlich höher als in Wasser-injizierten Kontrollen (B). Die Strom-Spannungs-Beziehung (D) der instantanen (Ii ●) und der stationären (Iss ○) Ströme aus (C) zeigen eine deutliche Spannungsabhängigkeit. Die Strom-Spannungs-Beziehung einer Kontrollzelle (□) ist ebenfalls gezeigt.

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass die induzierte Leitfähigkeit bei Oozyten aus diesem Frosch auf die Aktivität eines endogenen  $K^+$ -Auswärtsgerichteten zurückzuführen war. Eine endogene Kanalaktivität von *Xenopus laevis* Oozyten mit den ermittelten Eigenschaften wurde von Parker und Ivorra (1990) beschrieben. Deshalb soll auf diesen Kanal hier nicht näher eingegangen werden, da er vermutlich indirekt durch die Überexpression induziert wurde, aber keine eigentliche Kev-Aktivität darstellt.

#### Expression von Kev in Säugerzellen

Zwei permanente Säugerzelllinien werden zur heterologen Expression von Kanalproteinen häufig herangezogen: *human embryonic kidney cells* (HEK293) und *Chinese hamster ovary cells* (CHO-K1). Die endogenen Kanalaktivitäten dieser Zellen sind gut charakterisiert (Yu und Kerchner 1998, Jiang *et al.* 2002), sie weisen nur geringe endogene  $K^+$ -Leitfähigkeiten auf. Deshalb verwendete ich zusätzlich zu *Xenopus* Oozyten HEK293 und CHO-K1 Zellen

für die heterologe Expression von Kev. Dazu wurden  $10^6$  Zellen (40-60% konfluent) auf Kulturschälchen angezogen und mit  $1,5 \mu\text{g}$  Kev-Plasmid-DNA transfiziert. Transfizierte Zellen wurden identifiziert durch die Co-Transfektion mit einem Plasmid, das GFP (*green fluorescent protein*) kodiert. Alternativ wurden HEK293 Zellen auch mit einem Kev::GFP Fusionsprotein transfiziert. 2-3 Tagen nach der Transfektion wurde an isolierten (d.h. vom Zellverband gelösten) Zellen die Leitfähigkeit mit der Ganzzell *patch-clamp* Technik gemessen (Abb. 18).

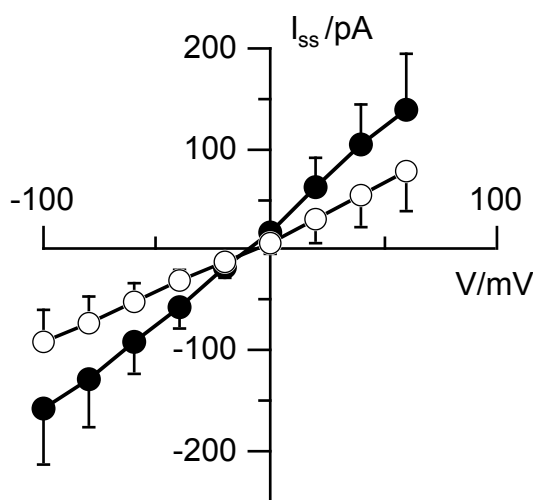


**Abb. 18:** Die Kev-Expression führt in HEK293-Zellen zu erhöhten Leitfähigkeiten. Mit der Ganzzell *patch-clamp* Technik wurde die Stromantwort bei Spannungspulsen von  $-140$  bis  $60$  mV (A) gemessen. Stromantworten einer GFP-transfizierten Kontrollzelle (B) und einer Kev-transfizierten HEK293-Zelle (C). (D) Gemittelte Strom-Spannungs-Beziehung von HEK293-Zellen, die mit Kev und GFP (●  $n=50$ ) oder nur mit GFP (○  $n=10$ ) transfiziert waren ( $\pm$  S.D.).

Die Expression von Kev in HEK293 ( $n=122$ ) führte bei 32% zu einer erhöhten Leitfähigkeit gegenüber Kontrollzellen, die entweder nur mit GFP transfiziert oder unbehandelt waren. Die Kev-transfizierten Zellen zeigten wie im Oozyten-System eine heterogene Antwort mit unterschiedlichen Stromamplituden und Kinetiken. Eine Selektivität für  $\text{K}^+$  war nicht gegeben: das Umkehrpotential änderte sich bei  $\text{K}^+$ -Konzentrationen im Badmedium von  $100$  mM bis  $25$  mM nicht im Vergleich zu Kontrollzellen.

Durch die Expression von Fusionsprotein Kev::GFP sollte ausgeschlossen werden, dass Zellen GFP exprimieren nicht aber Kev, was bei der Co-Transfektion theoretisch möglich ist. Die Messungen der Leitfähigkeit an Kev::GFP-transfizierten HEK293-Zellen (n=23) bestätigten die vorher beschriebenen Ergebnisse aus Experimenten mit Co-Transfektion von Kev und GFP. Nach der Expression von Kev::GFP trat bei 30% der Zellen eine Erhöhung unselektiver Leitfähigkeiten auf.

Wie Abb. 19 zeigt führte die Kev-Expression in CHO-K1-Zellen (n=21) zu einem geringfügigen Anstieg der Leitfähigkeit gegenüber nicht-transfizierten Kontrollzellen (n=10). Die Selektivität für  $K^+$  war in diesen Zellen nicht unterschiedlich von denen der Kontrollen.



**Abb. 19:** Expression von Kev in CHO-K1-Zellen. 2-3 Tage nach der Transfektion mit Kev wurde die Leitfähigkeit der Zellen mit der Ganzzell-patch-clamp Methode gemessen. Die Stromantworten bei Spannungspulsen von -100 bis 60 mV von Kontrollzellen (○) und Kev-transfizierten Zellen (●) sind gegen die Spannung aufgetragen  $\pm$  S.D. (n  $\geq$  10).

Zusammengefasst führte die heterologe Expression des putativen Kaliumkanals Kev aus dem *Ectocarpus siliculosus* Virus zu keiner neuen  $K^+$ -selektiven Leitfähigkeit in den untersuchten Zellen. In HEK293-Zellen führte die Kev-Expression zu einer nicht-selektiven Permeabilität. Ebenso in CHO-K1-Zellen. In Oozyten von *Xenopus laevis* zeigte sich bei 9 von 45 Zellen ebenfalls eine nicht-selektive Permeabilität. Bei den Oozyten aus einem einzelnen Frosch kam es zur Aktivierung eines endogenen  $K^+$ -Auswärtsgleichrichters.

### 2.3.3. Expression einer Chimäre aus Kev und Kcv – die Porenregion von Kev vermittelt K<sup>+</sup>-selektive Leitfähigkeit

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von EsV-1 ORF 223 (Kev) zeigt wie weiter oben beschrieben eine hohe Übereinstimmung zu anderen Kaliumkanälen aus prokaryotischen und eukaryotischen Organismen. Besonders hohe Übereinstimmung besteht mit der Aminosäuresequenz des viralen Kaliumkanals Kcv aus dem Genom von Chlorellavirus PBCV-1 (Abb. 20). Die Aminosäuresequenzen von Kcv und Kev sind zu 29% identisch und haben 55% homologe Aminosäuren. Im Bereich der Poren sind die beiden Sequenzen sogar zu 69% homolog und zu 59% identisch.

Kcv	1	MLVFSKELTRTEPFMIHLFILAMFVMI	27
Kev	1	MSRRLFATCGIAIALRGLVSGGVKEIVSERPLIDTSLVGGILSNLILLV	50
Kcv	28	YKFFPGGFENNFSVANPDKKASWIDCIYFGVTTHSTVGFGDILPKTTGAK	77
Kev	51	VFAELYWQLDQGDDHTHFGFSSAIDAYYFSAVTSSSVGYGDLLPKTPKAK	100
Kcv	78	LCTIAHIVTVFFIVLTL	94
Kev	101	LLTIAHILAMFFVMLPVVAKALEK	124

**Abb. 20:** Aminosäuresequenzen von Kcv und Kev. Beide Sequenzen haben 55% homologe (hellgrau) und 29% identische (dunkelgrau) Aminosäurereste.

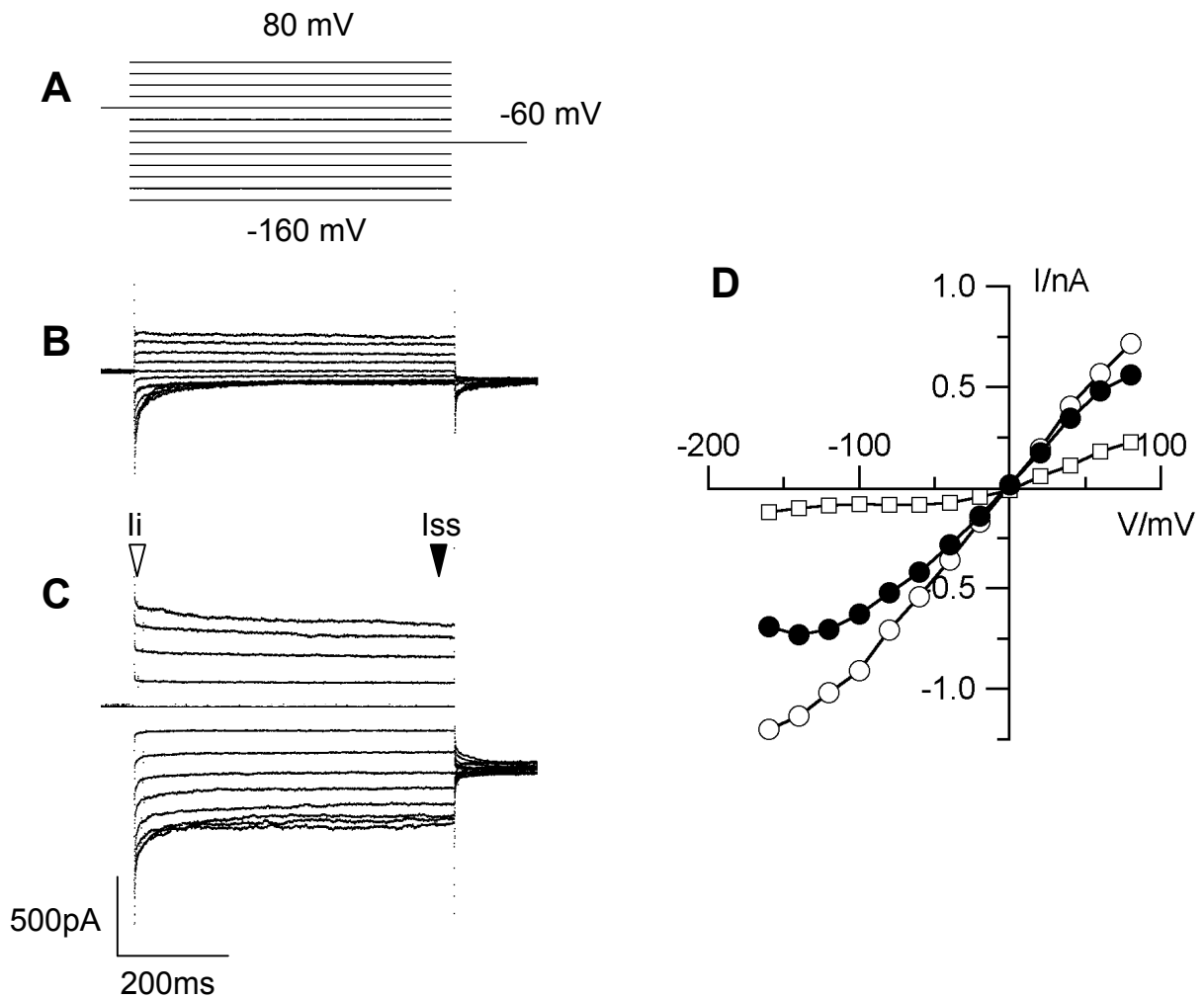
Trotz der Ähnlichkeiten in den Porenregionen von Kev und Kcv war mit Kev Protein in den verwendeten heterologen Expressionssystemen, anders als mit Kcv, keine Kaliumkanalaktivität mit *patch-clamp*-Messungen an der Zellmembran festzustellen. Die GFP-Fluoreszenz nach der Expression von Kev::GFP in HEK293 zeigte, dass das Protein tatsächlich synthetisiert wurde. Die Fluoreszenzverteilung in diesen Zellen war aber völlig unterschiedlich von der Verteilung von Kcv::GFP-Fusionsprotein (siehe Abschnitt 2.4.). Es erschien daher möglich, dass die Oberflächenexpression (d.h. die Synthese von funktionellem Protein und der Transport zur Plasmamembran) von Kev::GFP in HEK293-Zellen, anders als bei Kcv::GFP, nicht gegeben ist. Deshalb sollte mit den folgenden Experimenten überprüft werden, ob die Kev-Porenregion funktionell ist. Dazu habe ich ein chimäres Protein aus Kcv und Kev hergestellt, in dem die Pore von Kcv (E36 bis K72) mit der putativen Pore aus Kev (D60 bis L92) ersetzt war (Abb. 21). Diese Chimäre wird im folgenden Kcv/(p)Kev bezeichnet. Das Konstrukt wurde als GFP-Fusionsprotein (Kcv/(p)Kev::GFP) in HEK293-Zellen exprimiert. Die Leitfähigkeit von transfizierten HEK293-Zellen wurde mit der Ganzzell *patch-clamp* Methode getestet.

N-term      MLVFSKFLTRTEPFMIHLFILAMFVMYIKFFPGGF**DQGD****DHTHFG**  
                      **FSSAIDAYYFSAVTSSSVGYGDLPKTPKAKL**TTGAKLCTIAHIVTVFFIVLTLL      C-term

**Abb. 21:** Aminosäuresequenz des chimären Proteins Kcv(p)Kev. Das Konstrukt besteht aus dem Porenbereich von Kev (fett), flankiert von den transmembranen Domänen (unterstrichen) aus Kcv und den kurzen C- und N-Termini von Kcv.

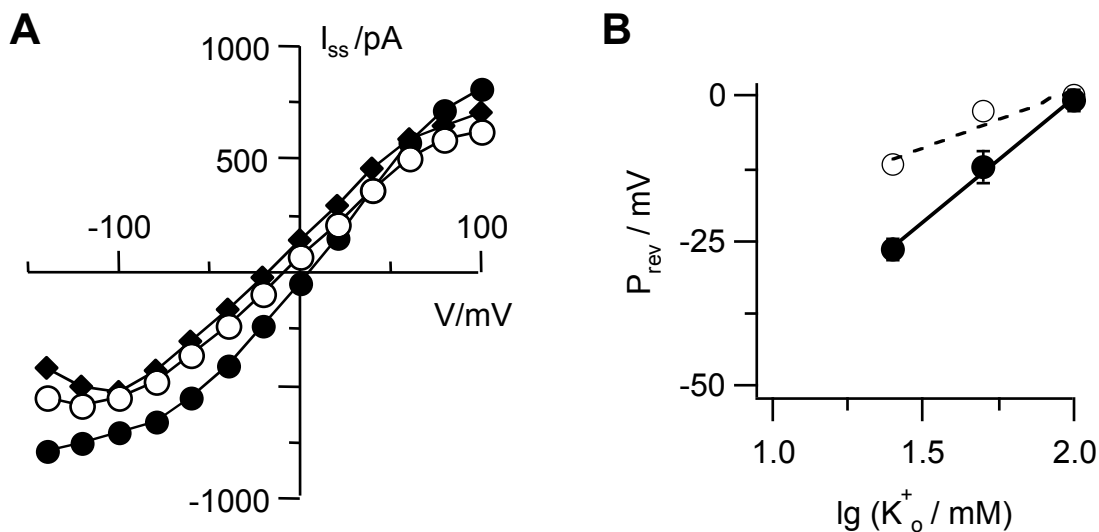


Die Expression von Kcv/(p)Kev::GFP in HEK293-Zellen führte zu einer Zunahme der Leitfähigkeit. Um in der Analyse die Kontamination mit endogenen Kanälen zu vermeiden, wurden nur solche Zellen berücksichtigt, deren stationären Ströme (Iss) bei  $-100$  mV größer als  $250$  pA waren. Bei 18% der transfizierten Zellen ( $n=73$ ) trat eine Erhöhung der Leitfähigkeit mit charakteristischen Stromantworten auf (Abb. 22). In einer Badlösung mit  $100$  mM KCl war die mittlere Stromamplitude bei  $-100$  mV  $1191 \pm 558$  pA ( $I_i$ , instantane Ströme) und  $-653 \pm 259$  pA ( $I_{ss}$ , stationäre Ströme). Die induzierten Ströme zeigen Ähnlichkeiten mit Kcv-induzierten Strömen in HEK293-Zellen (Moroni *et al.* 2002). Kcv/(p)Kev zeigte wie Kcv wildtyp eine Spannungsabhängigkeit bei Hyperpolarisation (siehe auch Abb. 27).



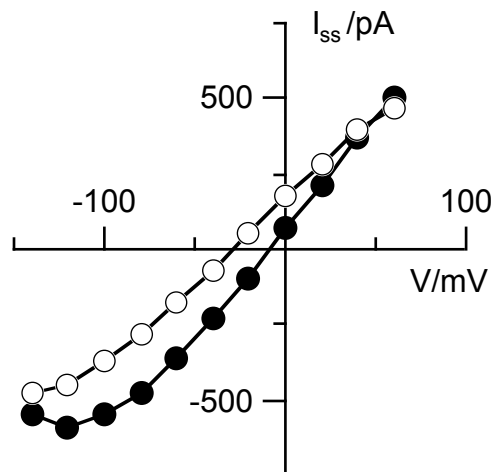
**Abb. 22:** Heterologe Expression der Pore von Kev als chimäres Protein Kcv/(p)Kev in HEK293-Zellen. (A) Spannungsprotokoll, (B) Stromantwort einer GFP transfizierten Kontrollzelle, (C) Stromantwort einer HEK293-Zelle, die mit Kcv/(p)Kev::GFP transfiziert war. (D) Strom-Spannungs-Beziehung von instantanen ( $I_i$ ,  $\circ$ ) und stationären ( $I_{ss}$ ,  $\bullet$ ) Strömen einer Kcv/(p)Kev-Zelle und stationäre Ströme einer GFP-transfizierten Kontrollzelle ( $\square$ ).

Zur Bestimmung der  $K^+$ -Selektivität wurden die Umkehrspannungen bei 25, 50 und 100 mM KCl im Badmedium bestimmt. Wie es für einen  $K^+$ -selektiven Kanal nach der Nernst-Gleichung zu erwarten ist, verschob sich die Umkehrspannung bei zunehmenden  $K^+$ -Konzentrationen zu positiveren Werten (Abb. 23 A). Abb. 23 B zeigt die lineare Beziehung aus der Auftragung von Umkehrspannungen gegen den Logarithmus der jeweiligen  $K^+$ -Konzentration. Die errechnete Steigung von 43 mV/Dekade bei Kcv/(p)Kev-transfizierten Zellen zeigte eine deutlich höhere  $K^+$ -Selektivität als Kontrollzellen mit 19 mV/Dekade. Mit Kcv wildtyp-Protein war ein Anstieg um 54,3 mV bei der Verzehnfachung der  $K^+$ -Konzentration beobachtet worden, welcher gut mit dem Wert für einen idealen  $K^+$ -selektiven Kanal (58 mV/Dekade) aus der Nernst-Gleichung überein stimmt (Moroni *et al.* 2002).



**Abb. 23:** Einfluss von verschiedenen  $K^+$ -Konzentrationen auf die Leitfähigkeit des chimären Proteins Kcv/(p)Kev. **(A)** Stromantwort von Kcv/(p)Kev transfizierten HEK293-Zellen mit 100 (●), 50 (○) und 25 (◆) mM KCl in der Außenlösung. **(B)** Im Nernst-plot sind die ermittelten Umkehrspannungen mit Kontrollzellen (○) und Kcv/(p)Kev-transfizierten Zellen (●) gegen den Logarithmus der  $K^+$ -Außenkonzentration aufgetragen ( $n=4$ ). Die Geradensteigung für Kcv/(p)Kev beträgt 43 mV/Dekade und für Kontrollzellen 19 mV/Dekade.

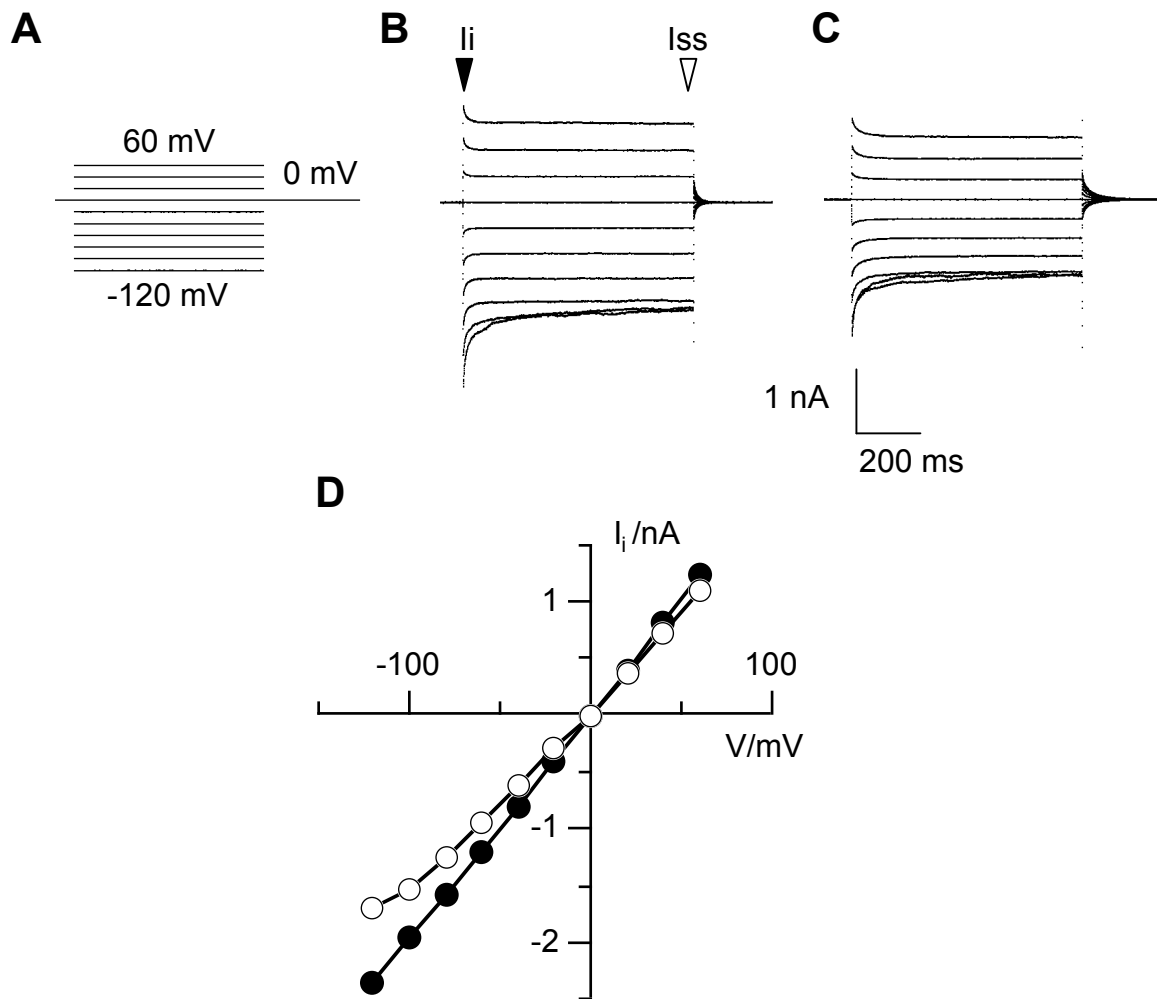
Um die Selektivität gegenüber  $Na^+$  zu ermitteln wurde KCl im Badmedium gegen NaCl ausgetauscht ( $n=2$ ). Das Umkehrpotential verschob sich von  $-12$  mV (in 50 mM KCl) nach  $-33$  mV (in 50 mM NaCl). Die Amplitude des Einwärtsstroms (gemessen bei  $-100$  mV) war in 50 mM NaCl um  $31 \pm 1\%$  geringer als in 50 mM KCl (Abb. 24). Auch bei diesen Experimenten zeigte die Chimäre Kcv/(p)Kev damit eine wesentlich geringere  $K^+$ -Selektivität als das Kcv wildtyp-Protein in Oozyten (Plugge *et al.* 2000) und HEK293-Zellen (Moroni *et al.* 2002).



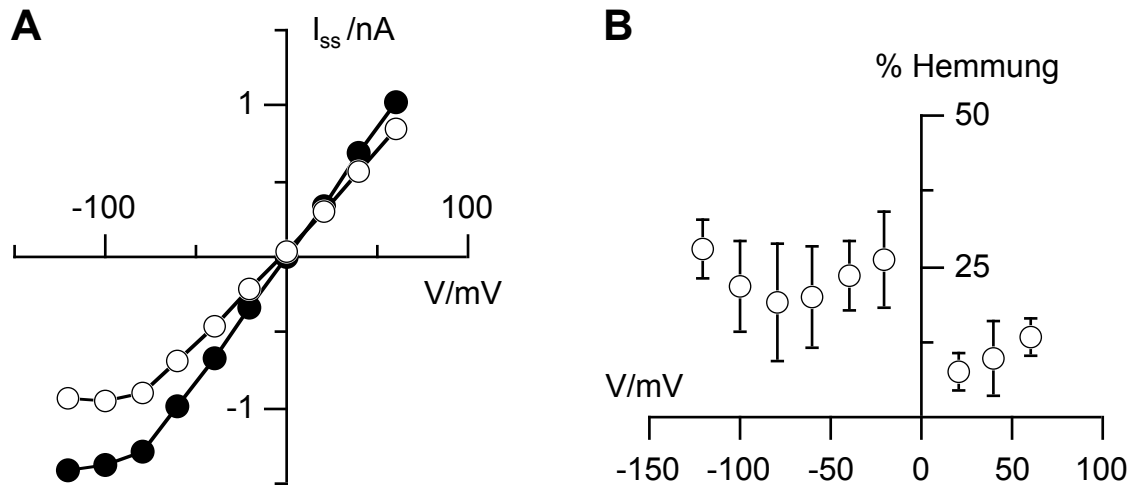
**Abb. 24:** Unterschiedliche Leitfähigkeiten von Kcv/(p)Kev für  $K^+$  und  $Na^+$ . Die Stromantwort ( $I_{ss}$ ) einer transfizierten HEK293-Zelle mit 50 mM KCl (●) und mit 50 mM NaCl (○) im Außenmedium sind gegen die Testspannung aufgetragen.

Die Hemmung von Kaliumkanälen durch Barium beruht auf der Blockierung der Kanalpore durch das zweiwertige Kation:  $Ba^{2+}$ -Ionen im extrazellulären Medium orientieren sich bei negativer Membranspannung zum Kanalmund hin. Das  $Ba^{2+}$ -Ion kann aber, anders als  $K^+$ , aufgrund des größeren Ionenradius die Pore nicht passieren. Eine spannungsabhängige Blockierung durch  $Ba^{2+}$  ist deshalb ein typisches Merkmal von Kaliumkanälen (Hille 2001). Für Kcv wurde eine steile Spannungsabhängigkeit der Blockierung mit  $Ba^{2+}$  gezeigt (Plugge *et al.* 2000). Also weist auch das einfachste bekannte Kaliumkanalprotein, Kcv, diese typische Eigenschaft auf. In den folgenden Experimenten sollte überprüft werden, ob eine spannungsabhängige Inhibierung mit  $Ba^{2+}$  auch in der Porenschimäre Kcv/(p)Kev erhalten bleibt.

Der hemmende Effekt von  $Ba^{2+}$  wurde mit 10 mM  $BaCl_2$  im Badmedium vor dem Hintergrund von 100 mM KCl untersucht: bei  $-100$  mV betrug die maximale Hemmung 31% gegenüber den Einwärtsströmen in den Zellen ohne  $BaCl_2$  (Abb. 25 B, C). Dabei wurden die instantane ( $I_i$ ) und die stationäre ( $I_{ss}$ ) Komponente der induzierten Ströme im gleichen Maße gehemmt (Abb. 25 D und Abb. 26 A). Abb. 26 zeigt, dass auch Kcv/(p)Kev spannungsabhängig durch  $Ba^{2+}$  inhibiert wird. Zwar wird nur ein relativ geringer Anteil des Kcv/(p)Kev-Stroms durch  $Ba^{2+}$  blockiert, dabei sind aber (Abb. 26 B) die Einwärtsströme deutlich stärker inhibiert ( $23 \pm 7\%$  des Gesamtstroms) als die Auswärtsströme ( $10 \pm 4\%$ ). Der Übergang zwischen der stärkeren Hemmung der Einwärtsströme und der geringeren Hemmung der Auswärtsströme (bei 0 mV) verläuft steil und reflektiert damit eine stringente Spannungsabhängigkeit.

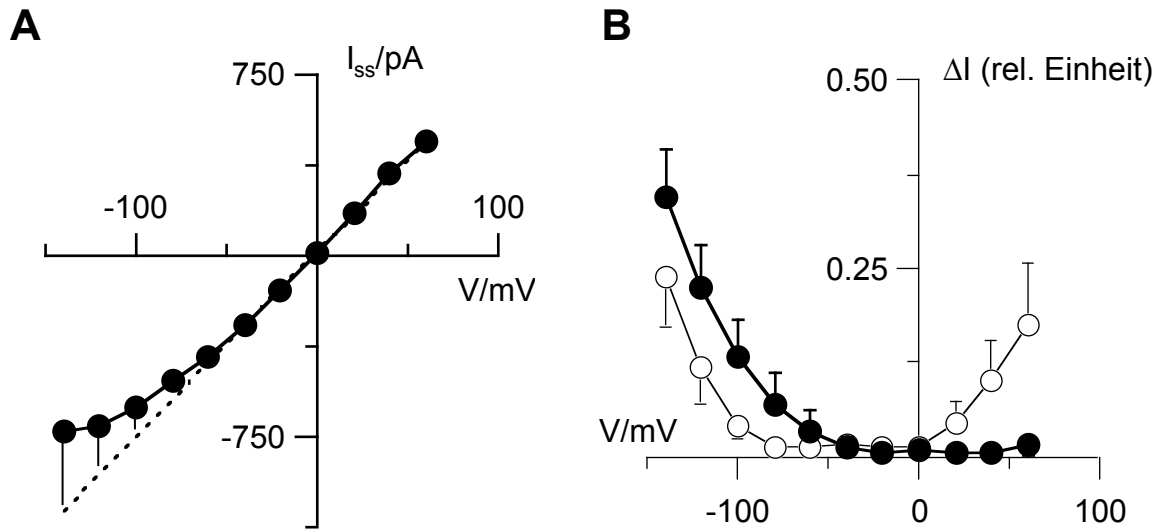


**Abb. 25:** Effekt von  $\text{Ba}^{2+}$  auf die Leitfähigkeit von Kcv(p)Kev in HEK293-Zellen. Die Stromantworten transfizierter Zellen bei Spannungspulsen von  $-120 \text{ mV}$  bis  $60 \text{ mV}$  (A) wurden mit der Ganzzell *patch-clamp* Technik gemessen. Die Außenlösung ( $100 \text{ mM KCl}$ ) enthielt (B) kein  $\text{BaCl}_2$  oder (C)  $10 \text{ mM BaCl}_2$ . (D) Strom-Spannungs-Beziehung der instantanen Ströme ( $I_i$ ) aus B und C ohne  $\text{BaCl}_2$  (●) und mit  $\text{BaCl}_2$  (○).



**Abb. 26:** Die Hemmung der Kcv/(p)Kev-Ströme durch  $Ba^{2+}$  ist spannungsabhängig. (A) Strom-Spannungsbeziehung der stationären Ströme ( $I_{ss}$ ) aus Abb. 25 ohne  $BaCl_2$  (●) und mit 10 mM  $BaCl_2$  (○) im Außenmedium. (B) Relative Hemmung der stationären Ströme mit  $Ba^{2+}$ . Die Berechnung der relativen Hemmung erfolgte mit  $1 - I_{ss, Ba} / I_{ss, 0}$  und ist in Prozent ( $\pm$ S.D.) angegeben ( $n=3$ ).

Bei Hyperpolarisation zeigten die Ströme von Kcv/(p)Kev eine Inhibierung, die bei stationären Strömen am deutlichsten war (Abb. 22 C, D). Die Spannungsabhängigkeit der stationären Ströme von Kcv/(p)Kev ist in der Inhibierungskurve dargestellt (Abb. 27 B). Für diese Analyse wurde die Differenz der gemessenen Ströme von einer linearen Strom-Spannungs-Beziehung ermittelt (Abb. 27 A) und auf den Maximalwert der Geraden bei  $-140$  mV bezogen. Die Inhibierungskurve von Kcv/(p)Kev zeigt eine Spannungsabhängigkeit bei Hyperpolarisation, die bei  $-140$  mV noch keine Sättigung erreicht. Im Gegensatz zur Inhibierungskurve von Kcv wildtyp-Protein zeigt die Kcv/(p)Kev-Inhibierungskurve schon bei Spannungen negativer als  $-40$  mV eine Inhibierung. Kcv-Ströme inhibieren bei Spannungen negativer als  $-80$  mV. Die zeitabhängigen Ströme von Kcv zeigen außerdem auch bei Spannungen positiver als  $0$  mV Inhibierung.



**Abb. 27:** Spannungsabhängige Inhibierung der stationären Ströme ( $I_{ss}$ ) der Chimäre Kcv/(p)Kev und von Kcv wildtyp. Die Stromantworten von transfizierten HEK293-Zellen (mit 100 mM KCl im Außenmedium) bei Spannungen von  $-140$  mV bis  $60$  mV wurden  $595$  ms nach Beginn der Spannungsänderung gemessen. (A) Eine lineare Strom-Spannungs-Kennlinie (gestrichelte Linie) wurde aus dem linearen Bereich der I/V-Kurve extrapoliert und die Differenz zu den gemessenen Strömen ermittelt. (B) Inhibierungskurven: Die relative Inhibierung der gemessenen Ströme gegenüber der linearen Strom-Spannungs-Kennlinie ist als Funktion der Testspannung ( $\pm$  S.D.) aufgetragen. Die Inhibierungskurven der Porenchimäre Kcv/(p)Kev (●) und von Kcv wildtyp (○) in HEK293-Zellen sind gezeigt ( $n=5$ ).

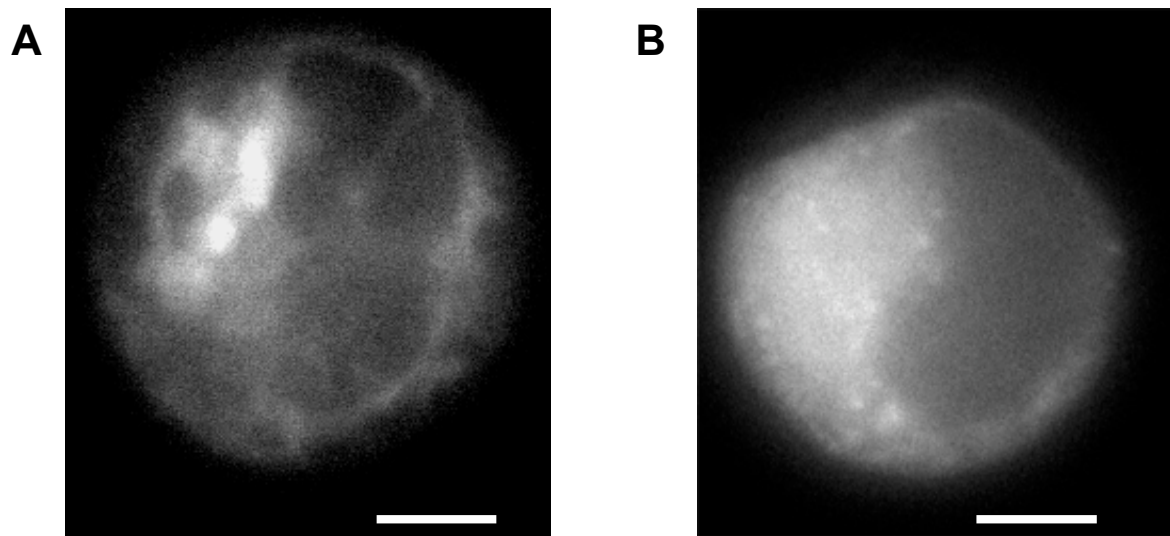
Aus der Aminosäuresequenz von Kev lässt sich die Porenregion eines Kaliumkanals ableiten. Die Expression dieser Pore als chimäres Protein Kcv/(p)Kev führte zu einer erhöhten Leitfähigkeit in transfizierten HEK293-Zellen. Zusammenfassend zeigte die induzierte Leitfähigkeit eine relativ geringe  $K^+$ -Selektivität, so auch gegenüber  $Na^+$ . Mit dem Kaliumkanal-Blocker  $Ba^{2+}$  war eine spannungsabhängige Inhibierung der Kcv/(p)Kev-Ströme zu messen.

#### 2.4. Kcv und Kev im heterologen Expressionssystem HEK293

Der Kaliumkanal Kcv aus dem Chlorellavirus PBCV-1 induziert an der Plasmamembran von Oozyten aus *Xenopus laevis*, in CHO- und in HEK293-Zellen charakteristische Leitfähigkeiten (Plugge *et al.* 2000, Gazzarrini *et al.* 2002). Obwohl die Porenregion von Kev funktionell ist (Abschnitt 2.3.3.) konnte mit Kev wildtyp-Protein in den genannten Zelltypen keine erhöhte  $K^+$ -selektive Leitfähigkeit gemessen werden (Abschnitt 2.3.2.). Als mögliche Ursache dafür kommt die Oberflächenexpression des Proteins in Frage. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen die Verteilung von Fluoreszenzsignal in HEK293-Zellen untersucht, die unterschiedliche viralen Kanäle als Fusionsproteine mit dem *green fluorescent protein* (GFP, aus der Qualle *Aequoria victoria*) exprimierten.

#### 2.4.1. Unterschiedliche zelluläre Verteilung von Kcv und Kev

HEK293-Zellen waren mit Kcv::GFP oder Kev::GFP transfiziert worden. Nach 2 Tagen wurde die GFP-Fluoreszenz in transfizierten Zellen durch UV-Licht angeregt und an einem inversen Mikroskop (Axiovert) detektiert und digital aufgezeichnet (Abb. 28).



**Abb. 28:** Fluoreszenzverteilung von GFP-Fusionsproteinen der viralen Kaliumkanälen Kcv und Kev in HEK293-Zellen. Die GFP-Fluoreszenz in HEK293-Zellen wurde 2 Tage nach der Transfektion mit Kcv::GFP (**A**) und Kev::GFP (**B**) mit UV-Licht angeregt und am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Größenstandards entsprechen 10  $\mu\text{m}$ .

In 33 HEK293-Zellen, die mit Kcv::GFP transfiziert waren akkumulierte die Fluoreszenz bei 21 Zellen in netzwerkartigen, tubulären Strukturen (Abb. 28 A). In 13 der 33 Zellen war um den Kern ein geschlossener fluoreszierender Ring zu erkennen. Der Bereich des Zellkerns war in allen Zellen deutlich geringer angefärbt als das Cytoplasma. Mit Kev::GFP transfizierte Zellen zeigten eine von Kcv::GFP unterschiedliche Fluoreszenzverteilung. Bei 40 untersuchten Zellen traten in keinem Fall netzwerkartig verzweigte Strukturen auf. Die Fluoreszenzmaxima traten bei 29 Kev::GFP-Zellen in punktförmigen Strukturen auf (Abb. 28 B). In 11 weiteren Zellen war das Fluoreszenzsignal homogen über die ganze Zelle, auch im Kern, verteilt. In Tab. 4 sind die unterschiedlichen Verteilungsmuster zusammengestellt.

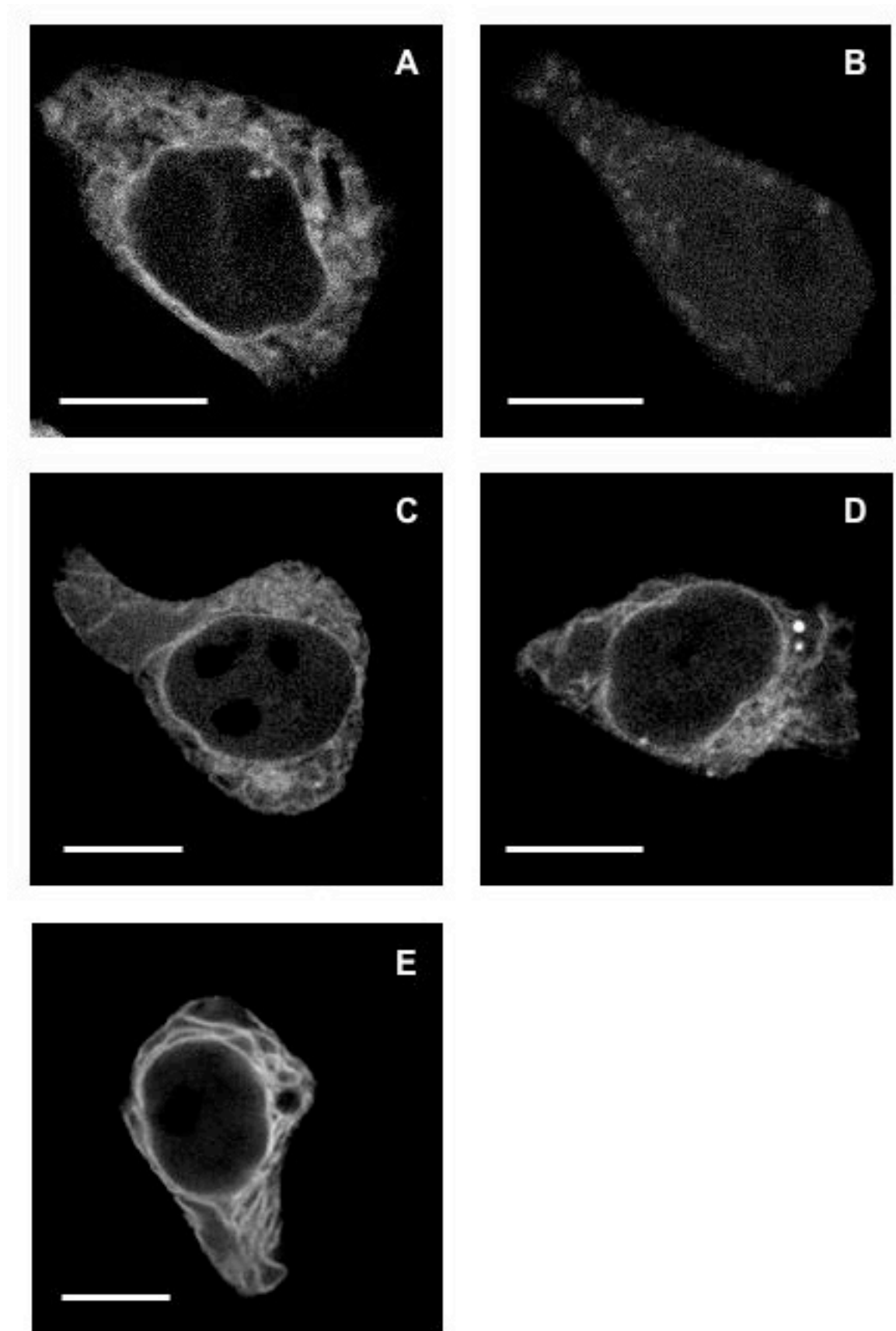
**Tab. 4:** Zelluläre Verteilung von Fluoreszenzsignal in HEK293-Zellen, die Chlorellavirus-Kanal Kcv oder den putativen Ectocarpusvirus-Kanal Kev als GFP-Fusionsproteine exprimierten. Zwei Tage nach der Transfektion wurde die Fluoreszenz nach UV-Anregung bei 750facher Vergrößerung aufgenommen. Die Verteilung wurde visuell beurteilt und in die zwei Klassen *netzwerkartig* oder *punktförmig* getrennt. Weitere Unterscheidungskriterien waren <sup>1</sup>eine deutlich geringere Fluoreszenz im Kern als im umgebenden Cytoplasma und <sup>2</sup>ein geschlossener Ring von Fluoreszenz um den Kernbereich. Gezeigt sind relative Werte (%) und absolute Zahlen (in Klammern).

Fluoreszenzmaxima	Kcv::GFP (n=33)	Kev::GFP (n=40)
netzwerkartig	64% (21)	-
punktförmig	-	73% (29)
geringer im Kern <sup>1</sup>	100% (33)	73% (29)
geschl. Ring um den Kern <sup>2</sup>	40% (13)	5% (2)

Mit der Confokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) können Ebenen einer Zelle mit einer Schichtdicke von etwa 600 nm ohne das Signale angrenzender Ebenen (*out-of-focus blur*) aufgenommen werden. Die Technik erlaubt es zelluläre Strukturen mit einem geringeren Signal/Rausch-Verhältnis zu mikroskopieren als es am Epi-Fluoreszenzmikroskop möglich ist. Im Folgenden wurden deshalb die Fusionsproteine Kcv::GFP, Kev::GFP und Kcv/(p)Kev::GFP mit der CLSM untersucht. Die Fluoreszenz wurde nach Anregung durch monochromatisches Laserlicht (488nm) in der Äquatorialebene der Zellen detektiert (Abb. 29). Die Untersuchungen sollten zeigen, ob die zelluläre Verteilung dieser Proteine mit der Eigenschaft korrelierte in HEK293-Zellen spezifische Leitfähigkeiten zu induzieren.

Die Untersuchung von Kcv::GFP und Kev::GFP mit CLSM bestätigte die Ergebnisse der Epi-Fluoreszenzmikroskopie: die Fluoreszenzmaxima waren bei Kcv::GFP-transfizierten Zellen tubulär netzwerkartig außerhalb der Kernregion verteilt (Abb. 29 A). Die Region unmittelbar um den Kern war als geschlossener Ring gefärbt. Zellen mit Kev::GFP zeigten Fluoreszenzsignal über die gesamte Zelle, Fluoreszenzmaxima waren punktförmig (Abb. 29 B). Die Fluoreszenz in HEK293-Zellen, welche die Chimäre Kcv/(p)Kev::GFP (Abb. 29 C) exprimierten zeigte dieselbe Verteilung wie Kcv::GFP-transfizierte Zellen: netzwerkartige Strukturen mit geringem Fluoreszenzsignal im Kern. Auch hier war der Bereich um den Kern als geschlossener Ring sichtbar.





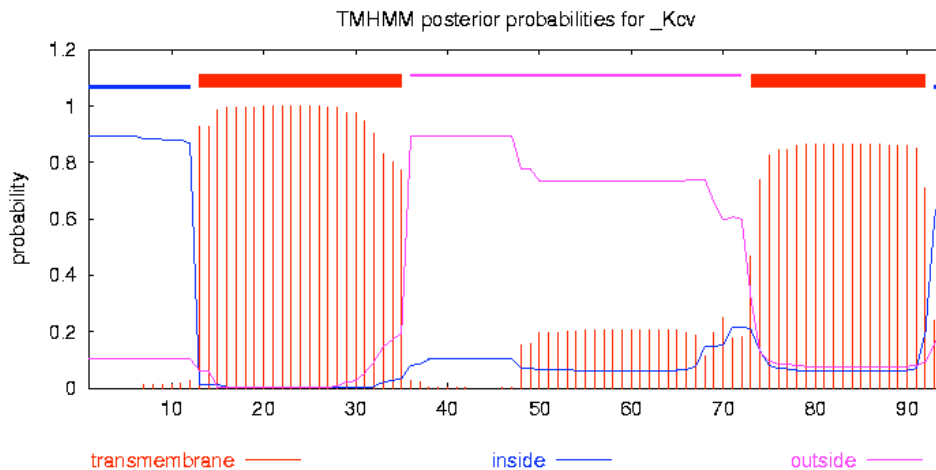
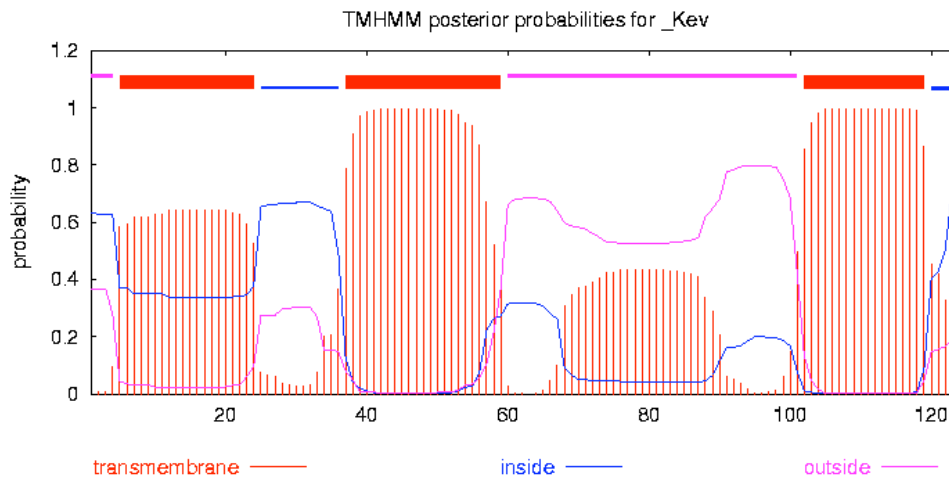
**Abb. 29:** Confokal-Bilder aus der Äquatorialebene von HEK293-Zellen 2 Tage nach der Transfektion mit (A) Kcv::GFP, (B) Kev::GFP, (C) Kcv/(p)Kev::GFP, (D) F113IVL::GFP und (E) F113IVLIVL::GFP. Größenstandards entsprechen 10 μm.

Die Experimente zur Verteilung von verschiedenen Kanal-GFP-Fusionsproteinen in HEK293-Zellen lassen sich wie folgt zusammenfassen: die Expression der beiden Konstrukte Kcv::GFP und Kcv/(p)Kev::GFP zeigte eine ähnliche Fluoreszenzverteilung mit netzwerkartiger Struktur. Anders Kev::GFP, hier zeigte sich eine Fluoreszenzverteilung mit relativ hohem Fluoreszenzsignal in Cytoplasma und Kern und mit punktförmigen Fluoreszenzmaxima.

### 2.4.2. Einfluss der Länge von Transmembrandomänen auf die zelluläre Verteilung

In diesem Versuchsteil sollte der Ursache für die unterschiedliche Verteilung von Kcv und Kev nachgegangen werden. Das Signal für die unterschiedliche zelluläre Verteilung ist sicherlich außerhalb der Kanalporen zu suchen, da die Porenschleife Kcv/(p)Kev dasselbe Verteilungsmuster wie Kcv zeigte. Ein Datenbank-gestützte Suche ergab keine Hinweise auf bekannte Signalsequenzen in den Aminosäuresequenzen von Kcv oder Kev. Allerdings wurde die Länge von Transmembrandomänen in einigen natürlich vorkommenden oder synthetischen Proteinen als ein dominantes Signal identifiziert, das die Akkumulation des jeweiligen Proteins in der Zielmembran bestimmt. Dabei können Längenunterschiede einer Helix um 2 Aminosäuren über die Verteilung in das eine oder das andere zelluläre Kompartiment entscheiden (Brandizzi *et al.* 2001). Die unterschiedlichen Membrandicken, welche vom Endoplasmatischen Retikulum über Golgi bis zur Plasmamembran hin zunehmen, sind für dieses Verhalten verantwortlich. Ein solcher Mechanismus könnte auch für Kcv und Kev in HEK293-Zellen zutreffen: Topologie-Vorhersagen mit TMHMM2.0 bestimmen für Kcv und Kev unterschiedliche Längen für die Carboxy-terminalen Transmembranhelices beider Proteine (Abb. 30). Das Programm TMHMM2.0 verwendet ein *Hidden Markov Model* und erstellt Proteinmodelle auf Basis der statistisch wahrscheinlichsten Topologie (Möller *et al.* 2001). Die Vorhersagen mit TMHMM2.0 zeichnet eine sehr hohe Genauigkeit aus (Sonnhammer *et al.* 1998, Krogh *et al.* 2001). Für die Länge der C-terminalen Helix von Kcv::GFP werden 23 Aminosäuren berechnet, bei Kev::GFP 18. Das Kev-Protein würde folglich mit geringerer Wahrscheinlichkeit in die Plasmamembran gelangen als Kcv weil die C-terminale Kev-Helix um fünf Aminosäurereste kürzer ist als bei Kcv. Um die Hypothese zu testen, dass Kcv und Kev aufgrund der unterschiedlichen Helixlängen anders in HEK293-Zellen verteilt sind, habe ich zwei Kev-Mutanten konstruiert, bei denen die C-terminale Transmembranhelix des Proteins um drei bzw. sechs Aminosäurereste verlängert ist. Das hydrophobe Motiv *Ile-Val-Leu* (der Kcv-Helix entlehnt) ist bei den Kev-Mutanten F113IVL einmal und bei F113IVLIVL zweimal eingefügt. Die beiden Mutanten wurden wiederum als GFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen exprimiert. Die Fusion von GFP an den C-Terminus der Proteine beeinflusst aber wahrscheinlich die Länge der C-terminalen Helix. Nach Berechnungen mit TMHMM2.0 wäre die C-terminale Helix von Kcv mit GFP um drei Aminosäuren länger. Bei der Mutante F113IVL resultierte ebenfalls eine um drei Aminosäuren längere transmembrane Helix. Tabelle 5 zeigt die mit dem TMHMM2.0-Programm berechneten Längen der Kanäle und Mutanten mit und ohne GFP.

Die Verteilung von Fluoreszenzsignal wurde zwei Tage nach der Transfektion am CLSM aufgenommen (s. Abb. 29).

**A****B**

**Abb. 30:** Topologie-Vorhersagen mit dem TMHMM2.0-Programm für die Aminosäuresequenzen von Kcv (oben) und Kev (unten). Rote Balken repräsentieren Aminosäuren in möglichen Transmembrandomänen, blaue Linien sind wahrscheinlich intrazellulär (*inside*), rosa extrazellulär (*outside*) orientierte Proteinbereiche. **(A)** Für Kcv werden Transmembranhelices von Position P13 bis F35 und von T73 bis L92 vorhergesagt. **(B)** Bei Kev bilden die Aminosäuren L5 bis V24 mit geringer Wahrscheinlichkeit eine Transmembranhelix. Mit hoher Wahrscheinlichkeit verfügt das Protein über zwei Transmembranhelices: von Position S37 bis L59 und von L102 bis A119.

Protein	C-term. Helix, Länge (aa)	
	ohne GFP	mit GFP
Kcv	20	23
Kcv/(p)Kev	23	23
Kev	18	18
F113IVL	23	20
F113IVLIVL	23	23

**Tab. 5:** Einfluss von C-terminal fusioniertem GFP auf die C-terminale Transmembranhelix bei Kcv, Kev und Mutanten der beiden Proteine. Mit dem Programm TMHMM2.0 wurde die wahrscheinlichste Topologie der Proteine und Proteinmutanten bestimmt. Die berechneten Längen der C-terminalen Helix sind für Proteine ohne GFP und mit C-terminal fusioniertem GFP (durch Insertion in den pEGFP-Vektor, Clontech) gezeigt. Die N-terminale Helixlänge war für alle Proteine identisch mit 23 Aminosäuren.

In HEK293-Zellen war die Fluoreszenzverteilung mit F113IVL::GFP ähnlich der Verteilung von Kcv::GFP, netzwerkartig im Cytoplasma, ein geschlossener Ring unmittelbar um den Kern und geringe Fluoreszenz im Kern (Abb. 29 D). Das gleiche Fluoreszenzmuster trat auch bei F113IVLIVL auf. Tubuläre Fluoreszenzmaxima waren deutlich hervorgehoben (Abb. 29 E).

Um zu beurteilen, ob die netzwerkartigen Fluoreszenzsignale bei den unterschiedlichen GFP-Konstrukten unterschiedlichen Verteilungen angehören, wurden die Netzwerk-Knotenpunkte in HEK293-Zellen ausgezählt, die mit Kcv, Kcv/(p)Kev, F113IVL oder F113IVLIVL transfiziert waren (n=5). In der Äquatorialebene der Zellen wurden Fluoreszenzsignale mit CLSM digital aufgezeichnet. Hintergrundsignal mit weniger als 25% der maximalen Intensität wurde abgezogen und die Anzahl der Knotenpunkte gezählt. In HEK293-Zellen, die Kev::GFP exprimierten, trat nie eine netzwerkartige Verteilung auf, folglich waren hier auch keine Knotenpunkte zu finden. Die Auswertung der übrigen Konstrukte mit netzwerkartiger Fluoreszenzverteilung ergab, dass in der Äquatorialebene dieser Zellen  $72 \pm 19$  Knotenpunkte auftraten. Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten waren nach Student t-Test nicht signifikant. Kev::GFP, mit punktförmigem Verteilungsmuster, steht also eine Gruppe von GFP-Fusionsproteinen mit netzwerkartiger Fluoreszenzverteilung (Kcv::GFP, Kcv/(p)Kev::GFP, F113IVL::GFP und F113IVLIVL::GFP) gegenüber.

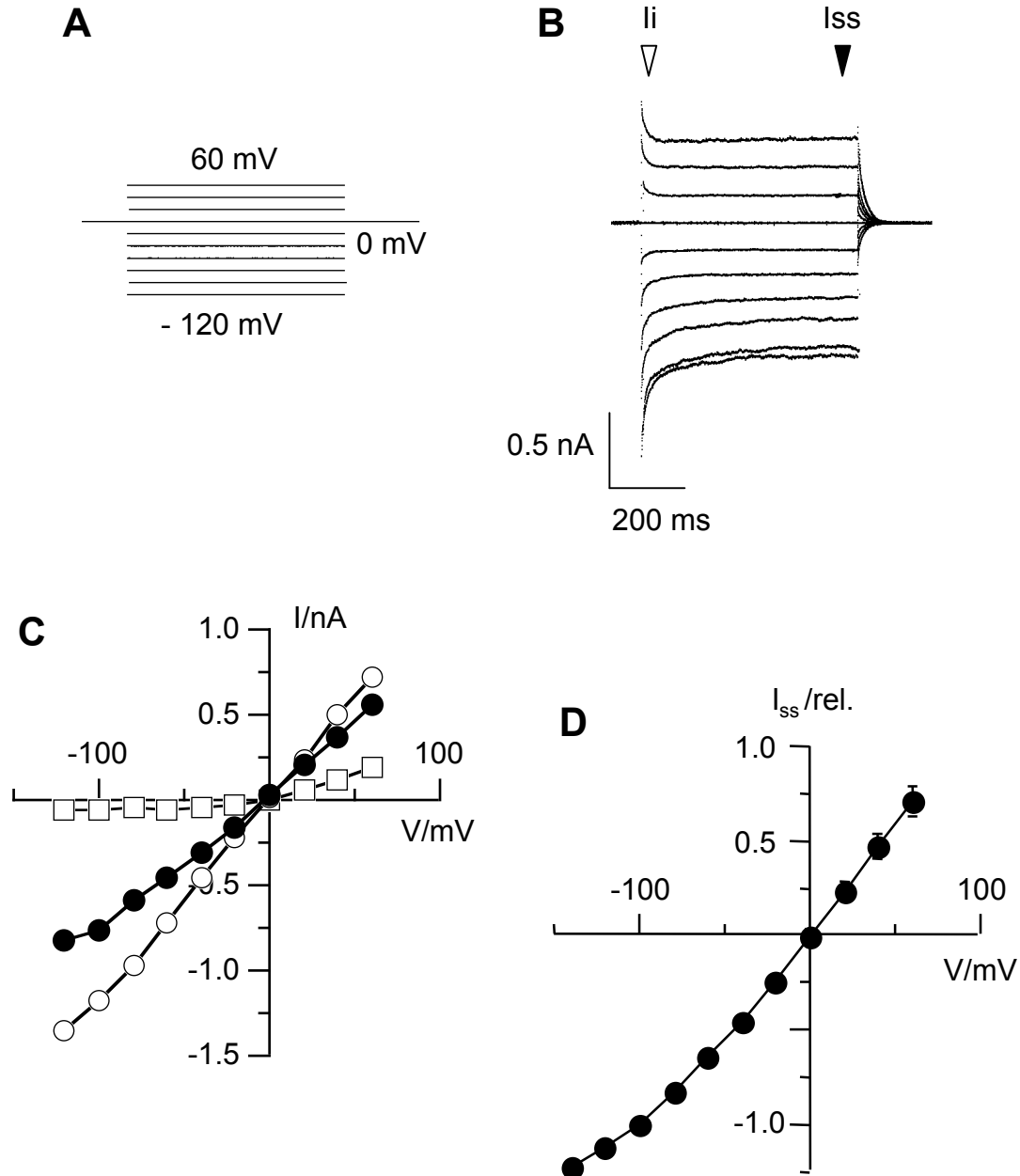
### *2.4.3. Elektrophysiologische Untersuchung von Kev-Mutanten mit verlängerten Transmembrandomänen*

Die heterologe Expression von Kev wildtyp-Protein führte in HEK293-Zellen wie weiter oben beschrieben nicht zur Ausprägung einer K<sup>+</sup>-selektiven Leitfähigkeit, welche mit der *patch-clamp* Technik an der Plasmamembran zu messen war. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Pore des putativen Kaliumkanals Kev funktional ist, wenn sie als chimäres Protein eingebettet in die transmembranen Domänen von Kcv exprimiert wird. Die netzwerkartige zelluläre Verteilung von Kcv::GFP und Kcv/(p)Kev::GFP korrelierte mit der Eigenschaft K<sup>+</sup>-selektive Leitfähigkeit an der Plasmamembran zu induzieren. Es kann also ein Zusammenhang der zellulären Verteilung mit der Oberflächenexpression vermutet werden. Daher wurden die beiden Kev-Mutanten F113IVL::GFP und F113IVLIVL::GFP, deren zelluläre Verteilungsmuster der von Kcv ähnelten, auf ihre K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit hin untersucht. Die Leitfähigkeitsänderungen an der Plasmamembran wurden wiederum mit der Ganzzell *patch-clamp* Technik in HEK293-Zellen gemessen.

Der überwiegende Anteil der mit F113IVL oder F113IVLIVL GFP-Fusionsprotein transfizierten HEK293-Zellen zeigte keine Leitfähigkeit unterschiedlich von GFP-transfizierten Kontrollzellen.

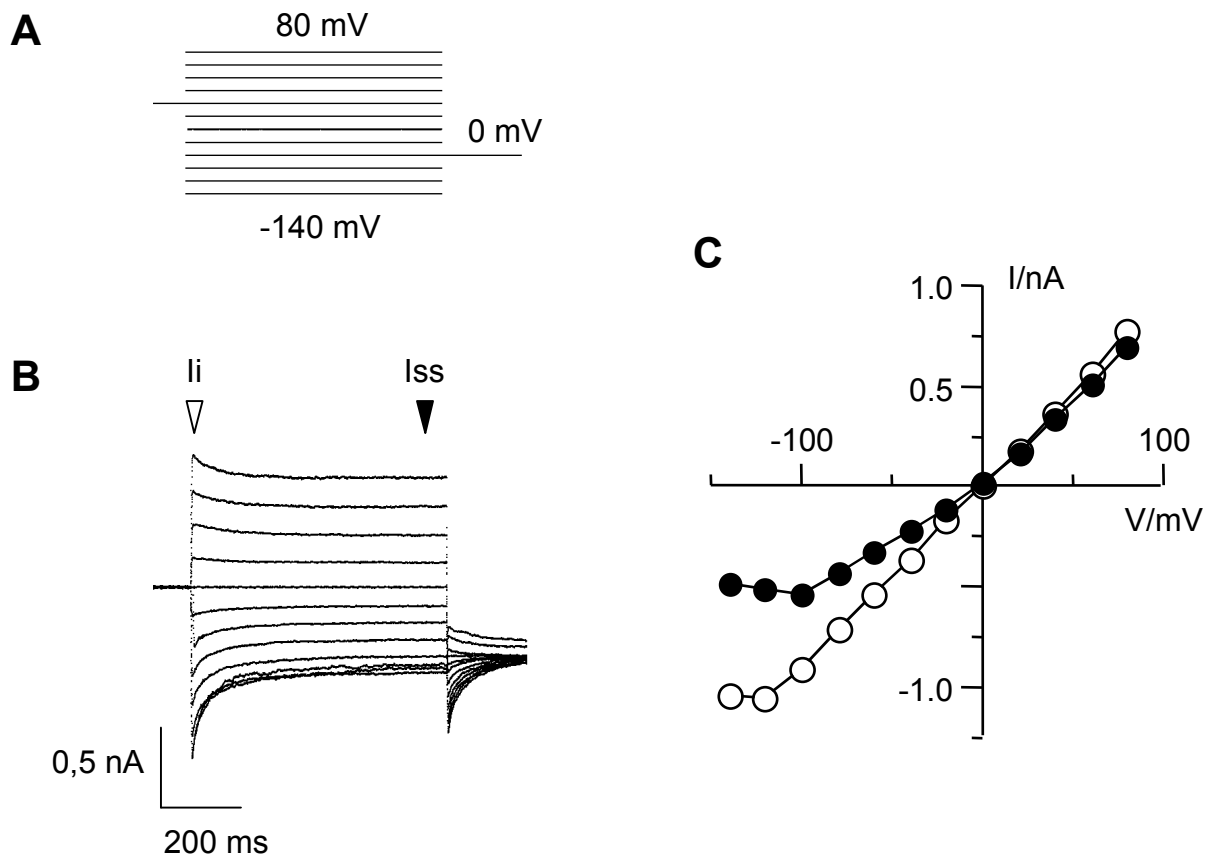
Bei F113IVL trat in 2 von 34 gemessenen Zellen eine erhöhte Leitfähigkeit auf, mit  $-721 \pm 25$  pA bei der Testspannung  $-100$  mV (Abb. 31). Die stationären Ströme in diesen Zellen zeigten eine geringe Spannungsabhängigkeit bei sehr negativen Testspannungen. Die normierten Ströme (Abb. 31 D) der beiden Zellen zeigen eine sehr ähnliche Strom-Spannungs-Beziehung der beiden F113IVL-transfizierten Zellen. Das Umkehrpotential änderte sich bei unterschiedlichen K<sup>+</sup>-Konzentrationen etwa um 23 mV/Dekade, vergleichbar

mit Kontrollzellen (19 mV/Dekade). Eine Selektivität gegenüber  $\text{Na}^+$  war allerdings gegeben: bei  $-100$  mV war der Strom in 100 mM NaCl um 58% geringer als in 100 mM KCl. Mit den Kaliumkanal Hemmstoffen  $\text{Ba}^{2+}$  (10 mM) und  $\text{Cs}^+$  (10 mM) zeigten sich keine hemmenden Effekte auf die beobachtete Leitfähigkeit.



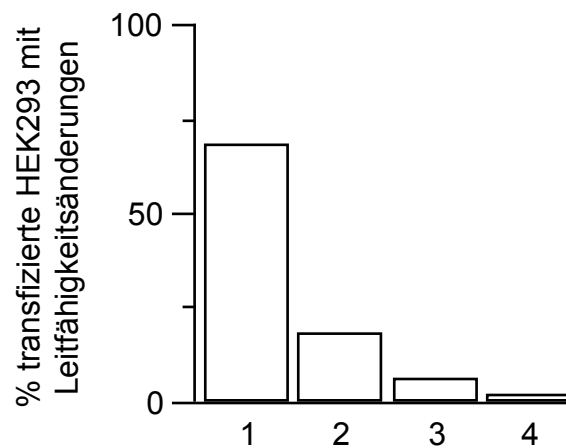
**Abb. 31:** Expression der Kev-Mutanten F113IVL in HEK293-Zellen. (A) Spannungsprotokoll mit Testspannungen von  $-120$  mV bis  $60$  mV. (B) Stromantwort einer Zelle 3 Tage nach der Transfektion. (C) Strom-Spannungs-Beziehung der instantanen ( $I_i$ ,  $\circ$ ) und stationären ( $I_{ss}$ ,  $\bullet$ ) Ströme aus (B) und die stationären Ströme einer HEK293-Kontrollzelle ( $\square$ ). (D) Normierte Ströme von zwei F113IVL transfizierten HEK293-Zellen. Die stationären Ströme ( $I_{ss}$ ) wurden auf den Wert bei  $-100$  mV bezogen und mit  $-1$  multipliziert; Mittelwerte ( $\pm$  S.D.) sind gegen die Testspannung aufgetragen.

Von 48 HEK293-Zellen, die mit F113IVLIVL transfiziert waren zeigte nur eine Zelle eine signifikante Erhöhung der Leitfähigkeit (Abb. 32). Die ermittelte  $K^+$ -Selektivität dieser Kev-Mutanten war nicht unterschiedlich von der in Kontrollzellen. Auch eine Inhibierung durch  $Ba^{2+}$  war nicht zu messen.



**Abb. 32:** Expression der Kev-Mutante F113IVLIVL mit einer Verlängerung der N-terminalen Transmembranhelix um 6 Aminosäuren in HEK293-Zellen. (A) Spannungsprotokoll mit Testspannungen von -140 mV bis 60 mV. (B) Stromantwort einer Zelle 3 Tage nach der Transfektion. (C) Strom-Spannungs-Beziehung der instantanen (li, ○) und stationären (Iss, ●) Ströme.

Die Transfektion von HEK293-Zellen mit den Kev-Mutanten F113IVL und F113IVLIVL führten also nur selten zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit gegenüber GFP transfizierten Kontrollzellen. In Abb. 33 ist die relative Häufigkeit gezeigt, mit der erhöhte Leitfähigkeiten mit den oben beschriebenen Eigenschaften auftraten.



**Abb. 33:** Relative Häufigkeit von erhöhten Leitfähigkeiten in HEK293-Zellen nach der Transfektion mit Kcv und Kev-Mutanten. (1) Kcv wt (n=47), (2) Kcv/(p)Kev (n=73), (3) F113IVL (n=34) und (4) F113IVLIVL (n=48).

Die Studien an Kev-Mutanten mit verlängerten C-terminalen Transmembranhelices zeigten: (i) Die Verteilung der GFP-Fusionsproteine F113IVL::GFP und F113IVLIVL::GFP in HEK293-Zellen ähnelt der netzwerkartigen Verteilung von Kcv::GFP. (ii) Eine Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit mit einer geringen  $K^+$ -Selektivität war mit F113IVL in Einzelfällen zu beobachten.

### 3. DISKUSSION

*Phycodnaviridae* umfassen eine Familie von großen, eikosaedrischen Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom, die eukaryotische Algen aus Süßwasser und Salzwasser infizieren. Die Genome von zwei Viren aus dieser Familie sind vollständig sequenziert: Chlorellavirus PBCV-1 und Ectocarpusvirus EsV-1. Obgleich beide Virusgenome mit über 300.000 bp sehr groß sind, haben sie nur 10% gemeinsame Gene. Dazu gehören die Gene zweier Kaliumkanalproteine: ORF a250r von PBCV-1 kodiert Kcv; für dieses Protein wurde Kaliumkanalaktivität in verschiedenen heterologen Expressionssystemen nachgewiesen (Plugge *et al.* 2000, Moroni *et al.* 2002). Im Genom von EsV-1 kodiert ORF 223 ein mögliches Kaliumkanalprotein, dessen Funktionalität in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. In dieser Arbeit wurde darüber hinaus der Frage nach der physiologischen Rolle von viralen Kaliumkanälen am Beispiel von Kcv nachgegangen.

#### 3.1. Mögliche Funktion des viralen Kaliumkanals Kcv im Replikationszyklus von *Paramecium bursaria* Chlorellavirus

PBCV-1 ist der Prototyp der Chlorellaviren, welche einzellige endosymbiontische Grünalgen des Stammes *Chlorella* NC64A infizieren. Dieses Virus-Wirts-System ist für die Untersuchung der physiologischen Funktion des viruskodierten Kaliumkanals aufgrund mehrerer Eigenschaften besonders gut geeignet: (i) Die Algen-Wirtszellen können sowohl auf festen Medien als auch in Flüssigkulturen angezogen werden. Milligramm-Mengen von Viren können aus wenigen Litern Flüssigkultur gewonnen werden. (ii) Bislang sind Chlorellaviren die einzigen Viren einzelliger Eukaryonten für die *plaque*-Tests entwickelt wurden. (iii) Die Virusinfektion kann synchronisiert werden.

Es finden sich mehrere Hinweise dafür, dass der virale Kaliumkanal Kcv im Virion von PBCV-1 vorhanden ist und eine Funktion bei einem frühen Ereignis der Infektion hat:

*Kcv scheint für die Replikation von PBCV-1 in Chlorella NC64A essentiell zu sein.*

Kaliumkanalhemmstoffe wie  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Cs}^+$  hemmen die Replikation von PBCV-1 in *plaque*-Tests. Die Pharmakologie der viralen Replikation und der Kcv-Aktivität in heterologen Expressionssystemen ist ähnlich (Plugge *et al.* 2000, Kang *et al.* 2004). Dies weist zum einen auf eine essentielle Bedeutung von Kcv während der Replikation hin, zum anderen lässt es indirekt auf eine Wirkung der Hemmstoffe von der extrazellulären Seite schließen. Denn  $\text{Ba}^{2+}$  oder  $\text{Cs}^+$ -Ionen sind aufgrund ihrer Ladung nicht membranpermeabel und können durch eine unselektive Aufnahme in *Chlorella*-Zellen keine hemmende Konzentrationen im millimolaren Bereich erreichen. Die Hemmung von Kcv kann folglich von extrazellulärer Seite her nur stattfinden, wenn Kcv im Virion vorhanden und damit für die genannten Hemmstoffe zugänglich ist.

*Das Membranpotential von Chlorella NC64A depolarisiert während der PBCV-1-Infektion.*

Mit dem potentialabhängigen Fluoreszenzfarbstoff Bis-Oxonol konnte in dieser Arbeit eine Depolarisation des Membranpotentials der Wirtszelle *Chlorella* NC64A während der Infektion mit Chlorellaviren gemessen werden. Diese Depolarisation zeigte mit Barium und Cäsium eine ähnliche Hemmbarkeit wie die Kcv-Kanalaktivität in heterologen Expressionssystemen und die Virusreplikation in *plaque*-Tests. Daraus kann gefolgert werden, dass die Hemmung der Virusreplikation und der Depolarisation durch die Empfindlichkeit von Kcv gegenüber den genannten Stoffen begründet ist. Weitere Ergebnisse sprechen dafür, dass Kcv für die Depolarisation der Wirtszelle während der ersten Minuten der Infektion verantwortlich ist: Zwei unterschiedliche Chlorellaviren, die Kcv-Homologe mit



verschiedenen  $\text{Cs}^+$ -Empfindlichkeiten kodieren, zeigten unterschiedliche Konzentrationsabhängigkeiten bei der Hemmung der Depolarisation mit  $\text{Cs}^+$ : In *Xenopus* Oozyten exprimiert war die Leifähigkeit von Kcv aus PBCV-1 kaum  $\text{Cs}^+$ -sensitiv (Plugge *et al.* 2000). Die virusinduzierte Depolarisation wurde von 10 mM  $\text{Cs}^+$  um 36% inhibiert. Im Gegensatz dazu war bei der Chlorellavirus-Varianten NY-2A, welche einen  $\text{Cs}^+$ -empfindlichen Kanal kodiert (Kang *et al.* 2004), durch diese  $\text{Cs}^+$ -Konzentration die Depolarisation fast vollständig (97%) inhibiert.

Da die Depolarisation sofort nach dem Mischen von Virus und *Chlorella* NC64A zu beobachten war, ist wiederum zu folgern, dass Kcv im Virion als funktionelles Protein vorliegt. Denn die Neusynthese von Kaliumkanalprotein könnte nicht in wenigen Minuten geschehen – erste virale mRNA ist 5 Minuten p.i. in den infizierten Zellen nachzuweisen (Schuster *et al.* 1986) und erste neu synthetisierte virale Proteine treten 15 min p.i. auf (Skrdla *et al.* 1984).

Das Chlorellavirus hat eine komplexe Struktur. Die äußere Hülle, das Capsid, ist aus mindestens 10 Proteinen und Glykoproteinen aufgebaut (Yamada *et al.* 1997). Darunter befindet sich eine Lipid-Doppelschicht, welche den Nukleoproteinkern umgibt. In Experimenten, bei denen diese innere Virusmembran durch die organischen Lösemittel Chloroform oder Toluol zerstört wurde, waren danach stark reduzierte *plaque*-Titer zu messen (Skrdla *et al.* 1984). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass mit ebenso behandelten Viren auch die virusinduzierte Depolarisation der Wirtszelle deutlich reduziert war. Nach Chloroform-Behandlungen war die Depolarisation vollständig inhibiert, die Hemmung nach Toluol-Behandlungen war 64% gegenüber den Kontrollmessungen. Die Vermutung, dass das hydrophobe Kcv-Protein in der inneren Virusmembran lokalisiert ist, wird durch diese Experimente unterstützt, da das Auflösen dieser Membran sicherlich Einfluss auf die Kcv-Aktivität hätte.

Die elektrophysiologische Charakterisierung von Kcv in heterologen Expressionssystemen und als rekonstituiertes Protein in Lipid-Doppelschichten zeigt zwei grundlegende Eigenschaften der Kcv-Leitfähigkeit: Der Kanal hat eine hohe Offenwahrscheinlichkeit bei allen Testspannungen; etwa 80% von Kcv sind stets in einem offenen, d.h.  $\text{K}^+$ -leitenden Zustand (Gazzarrini *et al.* 2001). Die Leifähigkeit eines einzelnen Kcv-Kanals ist mit ca. 100 pS (C. Pagliuca, pers. Mitteilung) im Bereich der meisten eukaryotischen Kaliumkanäle von 1-150 pS (Hille 2001). Mit einfachen Berechnungen lässt sich zeigen, dass nur wenig Kcv-Protein notwendig wäre eine dramatische Änderung des Membranpotentials einer einzelnen *Chlorella*-Zelle herbei zu führen. Pflanzenzellen haben bei millimolaren Ionenkonzentrationen im Außenmedium typischerweise eine Leitfähigkeit von etwa  $0,3 \text{ S m}^{-2}$  (Beilby und Walker 1996). Für eine einzelne *Chlorella*-Zelle mit  $100 \mu\text{m}^2$  ergibt sich damit eine Leitfähigkeit von etwa 30 pS. Der Einbau eines einzigen Kcv-Kanals würde also die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit dieser Zelle um mehr als das Dreifache erhöhen.

Das Membranpotential von Pflanzen ist von der Aktivität der Plasmamembran-ATPase dominiert und mit  $-110$  bis  $-250 \text{ mV}$  stark negativ (Lüttge 1985). Die Erhöhung der  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit durch Kcv würde eine Verschiebung des Membranpotentials hin zum Nernst-Gleichgewicht von Kalium zur Folge haben, bei millimolaren Außenkonzentrationen etwa  $-100 \text{ mV}$ . Für die Depolarisation wäre eine geringe Zahl an Kcv-Proteinen pro Zelle aufgrund der hohen Leitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit dieses Kanals ausreichend.

*Der Kaliumkanalhemmstoff Chloroquine verhindert die Synthese neuer Viruspartikel.*

Die Infektion von *Chlorella* NC64A mit PBCV-1 führt sehr schnell zur Synthese von Virusnachkommen in den infizierten Zellen. Mit dem Elektronenmikroskop sind bereits zwei Stunden nach der Infektion (p.i.) Capside in den sogenannten Virus-Assemblierungs-Zentren

zu erkennen (Van Etten und Meints 1991). Chloroquine ist ein weiterer Kaliumkanalhemmstoff, der die Kcv-Aktivität im *Xenopus* Oozyten-System inhibiert (pers. Mitteilung A. Moroni). Auch die Virusreplikation in *plaque*-Tests wurde durch Chloroquine stark gehemmt. 0,5 mM Chloroquine reduzierte die Virusreplikation um 78% (Keilmann 2003). Wurden die Infektionen von *Chlorella* NC64A in Anwesenheit von Chloroquine ausgeführt, dann waren nach zwei Stunden in keiner der elektronenmikroskopisch untersuchten *Chlorella*-Zellen Viruscapside zu finden - anders als in Zellen, die ohne Chloroquine im Medium infiziert waren (Keilmann 2003). Auch diese Experimente bestätigen, dass die Hemmung der Virusreplikation durch Kcv-Hemmstoffe wie Chloroquine früh stattfindet – hier heißt das: während der ersten zwei Stunden p.i..

*Das kcv-Gen wird in der späten viralen Replikationsphase transkribiert.*

Allgemein unterscheidet man bei Viren die frühe (prä-replikative) und die späte (post-replikative) Phase (Brock 1997). Dabei dienen die früh exprimierte Gene überwiegend der Replikation des Virusgenoms, späte Proteine tragen zum Aufbau und zur Freisetzung der folgenden Virusgeneration bei. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *kcv* als monocistronische mRNA in der späten Phase der viralen Replikation transkribiert wird. Die späte Transkription von *kcv* könnte bedeuten, dass das Protein eine Aufgabe bei der Virus-Assemblierung erfüllt, an der Freisetzung reifer Viruspartikel beteiligt ist oder in neue Viruspartikel eingebaut wird. Die Daten zur *kcv*-Transkription bekräftigen also die Annahme, dass das Protein Teil des Viruspartikels ist. Es ist auch denkbar, dass Kcv mehr als eine Funktion erfüllt, wie es für verschiedene andere Viroporine diskutiert wird (Fischer und Sansom 2002, Gonzalez und Carrasco 2003).

Weitere *kcv*-Transkripte traten auch während der frühen Replikationsphase auf. Diese kodierten *kcv* (ORF a250r) und das stromaufwärts gelegene ORF a248r, eine Proteinkinase. Schuster *et al.* (1991) fanden bei Northern-*blot*-Analysen weiterer PBCV-1-Gene ebenfalls Transkripte, die deutlich länger als ihre entsprechenden Gene waren. Die Autoren vermuteten, dass diese großen Transkripte durch das Auslassen von Transkriptions-Terminationsstellen zustande kommen. Die Sequenzierungen früher *kcv*-Transkripte in der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Hypothese. Zwei unterschiedlich lange bi-cistronische Transkripte werden an derselben Stelle, stromaufwärts von ORF a248r initiiert, ihre unterschiedlichen Längen kommen durch die Termination an zwei verschiedenen Positionen stromabwärts von *kcv* zustande. Es konnte aber gezeigt werden, dass nur die späte monocistronische *kcv*-mRNA mit einem Methylguanosin-Cap versehen ist. Ein solches Cap zeichnet gereifte Vollängen-mRNA aus (Alberts *et al.* 1994). Im Gegensatz zu dieser werden die frühen bi-cistronischen Transkripte ohne Cap wahrscheinlich nicht translatiert. Auch bei der Untersuchung von zwei weiteren Chlorellavirus-Varianten waren *kcv* homologe Gene als späte Gene identifiziert worden (Kang M, *et al.* eingereicht). Die Transkription von *kcv* im Chlorellavirus MA-1E zeigte wie in PBCV-1 ein komplexes Muster. Auch aus MA-1E infizierten Chlorellen konnte mit der 5'-RACE-PCR ein monocistronisches Transkript in der späten Phase identifiziert werden. Bei Chlorellavirus NY-2A trat ausschließlich in der späten Replikationsphase ein *kcv*-Transkript auf. Zusammenfassend wurde also bei den drei untersuchten Viren *kcv* immer als ein spätes Gen transkribiert.

Dies macht das *kcv*-Gen auch als Modell für die späte Transkription in Chlorellaviren interessant. Weiterführende Untersuchungen der *kcv*-flankierenden Genomsequenzen führten erstmals zur Identifikation eines Promoterelements der späten Transkription in Chlorellaviren (Kang M, *et al.* eingereicht). Bei 16 verschiedenen Chlorellavirus-Varianten war 9 bis 30 Nukleotide stromaufwärts vom *kcv*-Startcodon die hoch konservierte Sequenz AAAAATAnTT zu finden. Ein ähnlicher Vergleich der 3' von *kcv* gelegenen Nukleotidsequenzen lieferte die Sequenz TTTnTT 9 bis 26 Nukleotide stromabwärts vom *kcv*

Stoppcodon. Diese Sequenz ähnelt der Transkriptions-Terminationssequenz aus Vacciniaviren TTTTnT (Condit und Niles 2002). Auf der Basis dieser Ergebnisse kann erstmals ein einfaches Modell für die späte Transkription bei Chlorellaviren erstellt werden. PBCV-1 kodiert anders als viele andere DNA-Viren keine bekannte Form einer RNA-Polymerase. Jedoch kodiert das PBCV-1-Genom eine Vielzahl von Proteinen des Transkriptionsapparates, darunter sind vier Transkriptionsfaktoren, eine Guanylyltransferase, eine RNaseIII und weitere (Van Etten 2003). So könnte die Expression von Transkriptionsfaktoren aus der frühen Phase in der späten Phase zur Regulation der Synthese viraler Gene durch die RNA-Polymerase des Wirts führen. Tatsächlich ist ein solcher Mechanismus bei Vacciniaviren bekannt. Dort regulieren Genprodukte der frühen Phasen kaskadenartig die Expression von Genen der darauf folgenden Phase (Condit und Niles 2002). Pockenviren (wie die Vacciniaviren) sind wie die *Phycodnaviridae* große dsDNA-Viren mit komplexer Struktur. Auch aufgrund von Nukleotidsequenzvergleichen wurde auf eine Verwandtschaft von Vacciniaviren und *Phycodnaviridae* geschlossen (Schroeder *et al.* 2002, Chen und Suttle 1996).

*Die Entlassung der viralen DNA benötigt eine Interaktion mit der Wirtszelle.*

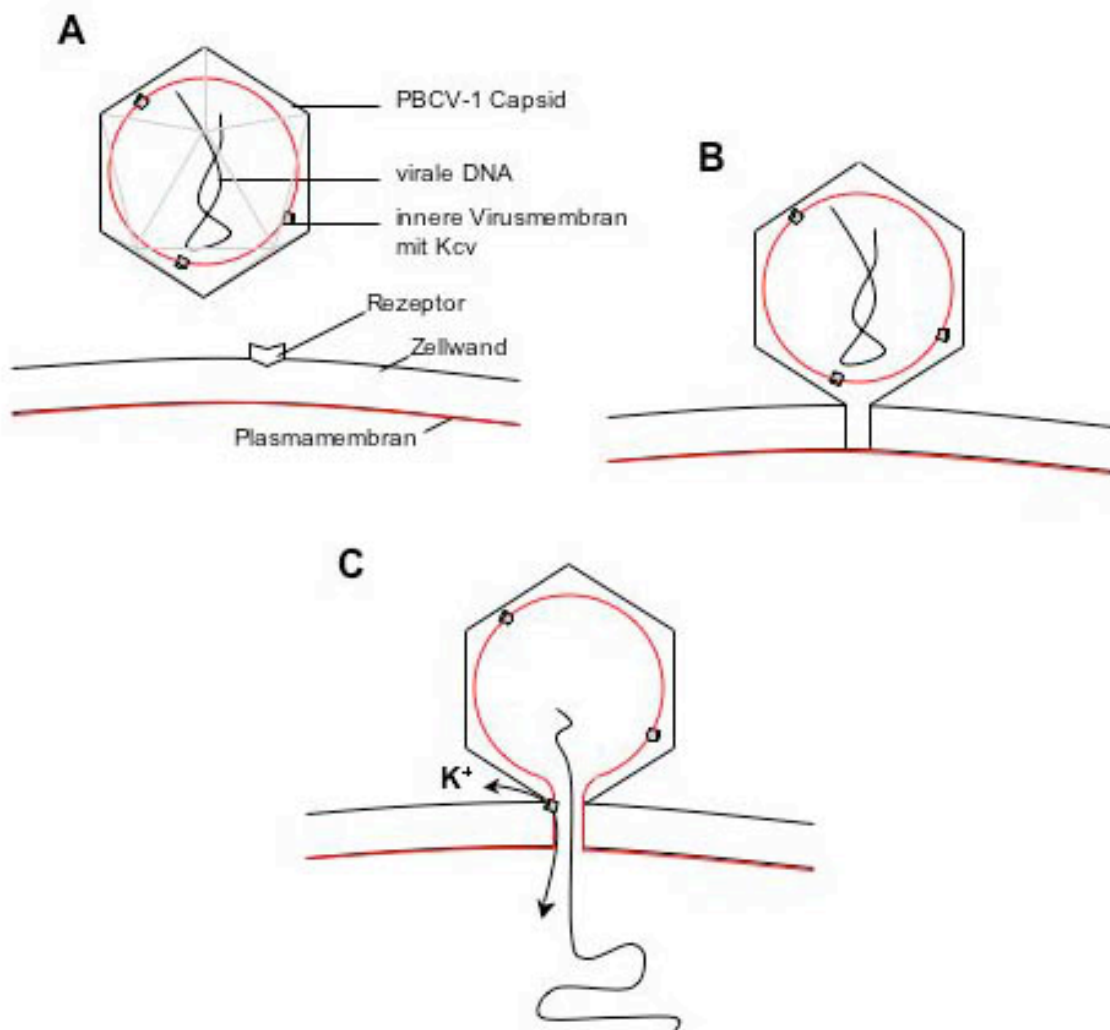
PBCV-1 heftet sich schnell und irreversibel an die Oberfläche der *Chlorella*-Zellwand mit einer Adsorptionsrate von  $5 \times 10^{-9} \text{ ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  an. Die Anheftung ist wirtsspezifisch und benötigt sehr wahrscheinlich Rezeptoren der Zellwand, da die Anheftung von PBCV-1 an Zellwandfragmente beobachtet wurde, eine Anheftung an Protoplasten von *Chlorella* NC64A aber nicht stattfindet (Meints *et al.* 1984, Meints *et al.* 1986). Die Anheftung erfolgt immer an einem Vertex des Capsids. Es ist nicht bekannt, ob alle Vertices des Capsids gleichartig sind. Bestimmte negativ kontrastierte Präparationen von PBCV-1-Partikeln zeigen eine asymmetrische Verteilung des Nukleoproteinkerns im Capsid und einen einzelnen Vertex pro Virion, der mit einer Spitze versehen ist. Stereo-elektronenmikroskopische Aufnahmen von angehefteten Viren lassen vermuten, dass fasernartige Fortsätze, die ebenfalls von einigen Vertices ausgehen, das Virion mit diesem besonderen Vertex an die Zellwand positionieren (Van Etten *et al.* 1991). Das Virus trägt die Zellwand-lyisierende Aktivität (Meints *et al.* 1984), die vermutlich ebenfalls an diesem speziellen Vertex lokalisiert ist, und freigesetzt wird, wenn durch die Rezeptorbindung strukturelle Änderungen des Capsids verursacht werden (Van Etten *et al.* 1991). Interessanterweise erfolgt nach der Anheftung von PBCV-1 an Zellwandfragmente der partielle Verdau der Zellwand, ohne jedoch die virale DNA zu entlassen. Die Autoren vermuteten daher, dass ein Signal der Wirtszelle, wie etwa die Verschmelzung von Virusmembran und Wirtszell-Plasmamembran, für die Entlassung der DNA benötigt wird.

Im Folgenden soll versucht werden die Ergebnisse zu einem Modell für die mögliche Funktionsweise von Kcv zusammenzufassen: (i) Kcv ist als Strukturprotein in der internen Virusmembran vorhanden. (ii) Nach lokalem Verdau der Zellwand fusionieren die Wirtszell-Plasmamembran und die interne Virusmembran, damit gelangt Kcv in die Plasmamembran. (iii) Der Einbau des viralen Kaliumkanals erhöht die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit der Plasmamembran und eine schnelle Depolarisation des Membranpotentials des Wirts ist die Folge (Abb. 34).

Zwei mögliche Konsequenzen aus der erhöhten Leitfähigkeit und der resultierenden Depolarisation der Wirtszell-Plasmamembran wären denkbar. Zum einen könnte die erhöhte  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit und die Aktivierung von spannungsabhängigen Anionenkanälen, die in Pflanzen sehr verbreitet sind (Barbier-Brygoo *et al.* 2000), zu einem Efflux von Kaliumionen führen. Dieser Efflux könnte dazu beitragen den hohen Turgor, der in Pflanzenzellen 1 MPa

betragen kann (Thiel *et al.* 1988), zu verringern und damit den Eintritt von viraler DNA gegen einen reduzierten Turgordruck der Zelle erlauben.

Zweitens breitet sich die Depolarisation der Wirtszell-Plasmamembran schnell über die gesamte Zelloberfläche aus und könnte damit als ein Signal dienen die Infektion von weiteren Chlorellaviren zu verhindern. Zwei Beobachtungen unterstützen diese Hypothese: Mehrere Chlorellaviren können an die Zellwand einer *Chlorella*-Zelle anheften ohne DNA zu entlassen (Van Etten 2002) und Polyinfektion, d.h. die Infektion einer *Chlorella* NC64A-Zelle durch mehrere Chlorellaviren ist nicht möglich (Chase *et al.* 1989).



**Abb. 34:** Modell der frühen Ereignisse während der Infektion von *Chlorella* NC64A durch PBCV-1. (A) Skizze der *Chlorella* Zellwand mit der darunter liegenden Plasmamembran (rot) und einem Rezeptor für PBCV-1. Darüber: Skizze von PBCV-1 mit dem Capsid, der inneren Virusmembran (rot) mit integriertem Kcv-Protein (grau) und viralem dsDNA-Genom. (B) Anheftung des Virus an den Rezeptor und partieller Verdau der *Chlorella*-Zellwand durch Proteine aus dem Virion. (C) Die Fusion der Membranen könnte zum Einbau von Kcv in die Zellmembran des Wirts führen. Eine erhöhte K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit der Wirtszelle würde zu einer Depolarisation der Zelle, der Aktivierung weiterer Kanäle und einem K<sup>+</sup>-Efflux führen, was eine Abnahme des Turgors und den erleichterten Eintritt der viralen DNA ermöglicht.

Im Widerspruch zu dem Modell konnte mit der massenspektrometrischen Analyse von ausgewählten PBCV-1-Proteinen Kcv nicht nachgewiesen werden. Die MALDI-TOF-Analyse wurde als Nachweismethode gewählt, da anti-Kcv-Antikörper für Immunlokalisationsstudien nicht zur Verfügung stehen. Versuche zur Antikörpersynthese mit rekombinanten Kcv-Fragmenten und vollständigem Kcv-Protein waren vermutlich ohne Erfolg, da das membranintegrale Kcv-Protein kaum antigene Bindestellen aufweist, wie eine Analyse der *antigenicity* nach Hopp und Woods (1981) zeigt. Man könnte argumentieren, dass bei einer Auswahl bestimmter Proteinbanden das gesuchte Protein nicht unter den ausgewählten sein könnte. Allerdings wurde mittlerweile im Labor von J.L. Van Etten (Lincoln, Nebraska, USA) ein Versuch unternommen sämtliche PBCV-1-Strukturproteine mittels MALDI-TOF *fingerprinting* zu identifizieren. Im Gegensatz zu älteren Arbeiten, aus denen nur 50 Proteine im Virion vermutet wurden, konnten mit der MALDI-TOF 85 Proteine identifiziert werden. Kcv war nicht darunter (J.L. Van Etten, pers. Mitteilung).

Auch wenn Kcv mit MALDI-TOF-Analysen nicht nachgewiesen wurde, ist es dennoch möglich, dass Kcv ein Bestandteil von PBCV-1-Partikeln ist. Die MALDI-TOF ist eine sensitive Nachweismethode, die in der Kombination mit Peptid-*fingerprinting* Proteine auch aus einem Peptidgemisch identifizieren kann (Lehmann 1996). Allerdings ist der Nachweis von Membranproteinen mit dieser Methode aufgrund der amphipathischen Natur solcher Moleküle oft schwierig. Sie aggregieren nach dem Entfernen aus der Lipidmembran, was in der nachfolgenden MALDI zu einer geringen Desorptions- und Ionisationseffizienz führt (Kim *et al.* 2001). Die gewählte Methode, eine Vorauswahl von hydrophoben Virusproteinen mit der temperaturinduzierten Triton X-114 Zwei-Phasentrennung und eine anschließende Identifizierung mittels MALDI-TOF, scheint dennoch prinzipiell möglich: drei PBCV-1-Proteine mit hydrophoben Bereichen wurden identifiziert, sie stellen mögliche membranassoziierte Proteine dar. Allerdings konnte diesen Proteinen noch keine Funktionen zugeordnet werden. Die Information über die möglicherweise membranassoziierte Lokalisation kann zur Diskussion ihrer Funktion beitragen. Vermutlich konnte ein MALDI-TOF-Nachweis dieser Proteine gelingen, weil sie überwiegend hydrophil sind. Kcv weist im Gegensatz dazu über 65% hydrophobe Proteinbereiche auf. Wenn Kcv, wie oben vermutet, mit geringer Kopienzahl im Virion vorkommt, dann würde der Nachweis des Proteins auch dadurch erschwert.

### **3.2. Das Genom des Ectocarpus siliculosus Virus kodiert eine funktionelle Kaliumkanalpore**

Lässt sich das Modell der Funktion von Kcv auch auf das Ectocarpus siliculosus Virus übertragen? Da beide Virusgenome unter wenigen gemeinsamen Genen zwei Kaliumkanäle kodieren, kann man annehmen, dass diesen Proteinen eine grundlegende Bedeutung zukommt. Zunächst war zu klären, ob das Kaliumkanalgen (ORF 223) aus EsV-1 einen funktionelles Protein kodiert.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF 223 (Kev) zeigt wichtige strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen bekannten Kaliumkanälen wie die Kaliumkanal *signature-sequence* und hydrophobe Transmembranhelices zu beiden Seiten einer putativen Porenregion. Dennoch führte die Expression von Kev wildtyp-Protein in keinem der verwendeten heterologen Expressionssysteme zur Ausprägung einer K<sup>+</sup>-spezifischen Leitfähigkeit. In den verschiedenen Systemen kam es durch die Expression des Proteins häufig zur Zunahme einer unspezifischer Permeabilität. Die Änderungen der Permeabilität

durch die Kev-Expression zeigte außerdem sehr unterschiedlichen Stromamplituden und war wenig reproduzierbar. Ähnliche Permeabilitätsänderungen wurden auch bei der Expression anderer viraler Genprodukte beschrieben. Diese waren durch die Aktivierung endogener Kanäle begründet (Shimbo *et al.* 1995) oder auf eine Schwächung der Plasmamembran zurückzuführen (Gonzalez und Carrasco 2003). Es handelte sich vermutlich auch bei der erhöhten Permeabilität durch die Kev-Expression um solche sekundären Effekte.

Dass Kev aber eine intrinsische  $K^+$ -Leitfähigkeit besitzt, konnte mit der Expression des chimären Proteins Kcv/(p)Kev gezeigt werden, das aus der Kev-Porenregion und den terminalen Domänen von Kcv konstruiert war. Die Pore von Kaliumkanälen ist die Region mit der höchsten Homologie (Heginbotham *et al.* 1994). Der Austausch von Porenregionen bei verwandten Kaliumkanälen (Hoth *et al.* 2001) und sogar zwischen Kanälen eukaryotischen und prokaryotischen Ursprungs (Lu *et al.* 2001) ergab funktionsfähige Kaliumkanäle. Auch in der vorliegenden Arbeit führte die Expression der Kcv-Kev-Chimären in HEK293-Zellen zu einer Kaliumkanalaktivität, welche charakteristische Merkmale von Kcv bewahrt hat:

(i) Bei 18% der transfizierten Zellen traten erhöhte Leitfähigkeiten auf. Die durchschnittliche Amplitude der Kcv/(p)Kev-Ströme war mit etwa -700 pA (bei -100 mV) mit der von Kcv wildtyp vergleichbar. Bei der Expression von Kcv in HEK293-Zellen treten meist Leitfähigkeiten um -800 pA (bei -100 mV) auf, daneben treten mit Kcv relativ selten Ströme über -1 nA auf (Moroni *et al.* 2002).

(ii) Die Leitfähigkeit von Kcv/(p)Kev in HEK293-Zellen hatte eine gewisse  $K^+$ -Selektivität. Die Umkehrspannungen bei unterschiedlichen extrazellulären  $K^+$ -Konzentrationen näherten sich dem jeweiligen  $K^+$ -Gleichgewichtspotential. Die Geradensteigung im Nernst-plot von 43 mV pro Dekade deutet jedoch auf eine relativ geringe Spezifität hin. Tatsächlich diskriminierte Kcv/(p)Kev auch nur wenig gegenüber  $Na^+$ . Es wäre bei Kcv/(p)Kev deshalb eher von einem Kationenkanal als von einem Kaliumkanal zu sprechen. Möglicherweise verfügt das Kev wildtyp-Protein aber (in seiner natürlichen Umgebung) über eine höhere  $K^+$ -Selektivität, die durch das Einfügen der Kev-Pore in das Kcv-Protein verloren ging. So wurde am Beispiel von Kcv gezeigt, dass selbst der Austausch einzelner Aminosäuren in den Transmembrandomänen zu geänderter Ionenselektivität und Hemmbarkeit führt (Kang *et al.* 2004).

(iii) Eine spannungsabhängige Inhibierung durch Kanalblocker wie  $Ba^{2+}$  ist für Kaliumkanäle charakteristisch (Hille 2001). Die durch Kcv/(p)Kev induzierte Leitfähigkeit wurde zu einem relativ geringen Anteil von 10 mM  $Ba^{2+}$  im Außenmedium gehemmt. Der  $Ba^{2+}$ -sensitive Anteil der Leitfähigkeit war aber bei negativen Spannungen deutlich stärker gehemmt als bei positiven Strömen und die Spannungsabhängigkeit zeigte bei 0 mV einen steilen Verlauf. Bei weniger als 100 mV Spannungsunterschied findet der Übergang von maximaler zu minimaler Hemmung statt. Eine steile Spannungsabhängigkeit mit ähnlichem Verlauf wurde auch beim  $Ba^{2+}$ -Block von Kcv-Strömen in Oozyten beobachtet (Plugge *et al.* 2000).

(iv) Bei allen Testspannungen war eine zeitabhängige Inaktivierung der Kcv/(p)Kev-Ströme zu sehen. Diese Kinetik wurde nicht näher untersucht.

(v) Die Kcv/(p)Kev-induzierten Ströme waren spannungsabhängig. Wie Kcv wildtyp (Moroni *et al.* 2002), so zeigte auch die Leitfähigkeit der Chimären Kcv/(p)Kev Inaktivierung bei Testspannungen unter -80 mV (Hyperpolarisation). Anders als die Chimäre inaktiviert Kcv aber auch bei sehr positiven Testspannungen. Die Unterschiede bei den Inaktivierungskurven beider Kanäle (Abb. 27 B) lassen sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Selektivitäten begründen. Da Kcv/(p)Kev neben  $K^+$  auch  $Na^+$  gut leitet, ist hier das Umkehrpotential bei derselben Ionenkonzentration wesentlich stärker vom Nernst-

Gleichgewicht für  $\text{Na}^+$  (positives Potential) beeinflusst. Die applizierten Spannungen sind deshalb bei den beiden Kanälen unterschiedlich weit vom jeweiligen Ruhepotential entfernt.

Die durch Kcv/(p)Kev induzierte Leitfähigkeit zeigte also die wesentlichen Merkmale einer Kaliumkanalaktivität. Dennoch war mit Kev wildtyp-Protein keine solche Aktivität zu messen. Als eine mögliche Ursache für das Fehlen charakteristischer Leitfähigkeiten bei der Expression von Kev wildtyp-Protein in HEK293-Zellen konnte die intrazelluläre Verteilung gefunden werden. Bei der Expression in HEK293-Zellen akkumuliert Kcv::GFP überwiegend in Endomembranen und zu einem geringeren Anteil in der Plasmamembran (Moroni *et al.* 2002). Anders als die beiden funktionsfähigen Kanäle Kcv und Kcv/(p)Kev war mit Kev eine punktförmige Fluoreszenzverteilung der jeweiligen GFP-Fusionsproteine zu sehen. Auch bei starker Vergrößerung war mit Kev::GFP kein Hinweis auf eine membranständige Fluoreszenz zu finden. Die unterschiedliche zelluläre Verteilung und die fehlende Kaliumkanalaktivität (bei einer funktionellen Pore) lassen vermuten, dass Kev nicht an die Plasmamembran gelangt.

Meist bestimmen Signalsequenzen den Transport von Membranproteinen an bestimmte zelluläre Kompartimente (Hopkins 1992). Eine Datenbankrecherche lieferte aber keine erkennbaren Signalsequenzen in den beiden viralen Proteinen. In Hefe (Rayner *et al.* 1997), in tierischen Zellen (Pedrazzini *et al.* 1996) und in Pflanzen (Brandizzi *et al.* 2002) wurde die Länge von Transmembrandomänen als ein Signal zur Sortierung von Membranproteinen zu ihren Zielkompartimenten gefunden. Dabei ist die Länge von Transmembranhelices das entscheidende Kriterium und dominiert sogar über einzelne Signalsequenzen. Bei pflanzlichen und tierischen Zellen nimmt die Dicke der Membranen von ER über Golgi bis zur Plasmamembran hin zu (Rayner *et al.* 1997). Es wird vermutet, dass die Dicke der Membran die Verteilung von Membranproteinen bedingt. Dieser Mechanismus könnte auch für die Verteilung der viralen Kanalproteine in HEK293-Zellen verantwortlich sein. Vorhersagen über die Länge der C-terminalen Helices mit dem TMHMM-Algorithmus (Sonnhammer *et al.* 1998) ergeben für Kev 18 und für Kcv 20 Aminosäuren. Für GFP-Fusionsproteine wird ein noch deutlicherer Unterschied vorhergesagt. Danach umfasst die C-terminale Helix von Kev::GFP 18, bei Kcv::GFP 23 Aminosäuren. (Die Länge der N-terminalen Helices beider Proteine ist mit 23 Aminosäuren identisch). Bei einfach membrandurchspannenden Proteinen entscheidet schon ein Unterschied von 2 Aminosäuren über die Verteilung in das eine oder andere Kompartiment (Brandizzi *et al.* 2002).

Die Untersuchung der intrazellulären Verteilung von Kev-Mutanten mit verlängerter Carboxy-terminaler Helix bestätigte die Hypothese, dass die Helixlänge entscheidend ist. Die Einführung von drei hydrophoben Aminosäureresten Ile-Val-Leu in die C-terminale Helix bei der Kev-Mutanten F113IVL::GFP führte nach TMHMM-Berechnungen zu einer Helix mit 20 Aminosäuren Länge. Der TMHMM-Algorithmus sagt bei der Insertion von sechs hydrophoben Aminosäureresten in der Mutanten F113IVLIVL::GFP eine Länge von 23 Aminosäuren voraus. Auch für die Chimäre Kcv/(p)Kev::GFP werden 23 Aminosäuren für die C-terminale Helix berechnet. In HEK293-Zellen zeigten all diese Kev-Mutanten als GFP-Fusionsproteine dieselbe netzwerkartige Fluoreszenzverteilung wie Kcv::GFP. Der Unterschied im Fluoreszenzmuster fällt also mit der C-terminalen Helixlänge zusammen: Kcv und die untersuchten Kev-Mutanten hatten um 2 oder 5 Aminosäurereste längere Helices als das Kev-Protein.

Allerdings zeigten die beiden Kev-Mutanten F113IVL und F113IVLIVL trotz der ähnlichen Verteilung wie Kcv nur in Einzelfällen erhöhte Leitfähigkeiten, die außerdem geringe  $\text{K}^+$ -Selektivität zeigten. Folglich muss es weitere Faktoren geben, die in heterologen Systemen der Expression von Leitfähigkeiten durch F113IVL und F113IVLIVL entgegenstehen.

Mögliche Ursachen sind beispielsweise fehlerhafte Faltung oder Tetramerisierung des Proteins in HEK293-Zellen, sodass nur selten in einzelnen Zellen Kaliumkanal-ähnliche Leitfähigkeiten ausgeprägt werden. Denn ein hoch selektives System der Qualitätssicherung sorgt in Säugerzellen dafür, dass nur korrekt gefaltete und assemblierte Membranproteine aus dem ER und weiter aus dem Golgi-Apparat an ihre Zielkompartimente gelangen (Ellgaard *et al.* 1999). Dies gilt ganz besonders für Kaliumkanäle, da sie wesentlich für die Erregbarkeit einer Zelle verantwortlich sind (Griffith 2001, Ma und Jan 2002). Strukturanalysen von  $K_{ir}$  Kanälen (Minor *et al.* 1999) und Röntgenstrukturanalysen von KcsA (Doyle *et al.* 1998) und KirBac1.1 (Kuo *et al.* 2003) ergaben, dass die TM2-Helix (die Transmembranhelix C-terminal der Pore) dieser Kanäle Kontakt zur Kanalpore hat und damit am Aufbau der Pore unmittelbar beteiligt ist. Eine Untersuchung von Strukturhomologien zwischen KcsA und Kcv ergab, dass bei dem viralen Kaliumkanal die C-terminale Transmembranhelix eine homologe Struktur zu TM2 von KcsA bildet (Gazzarrini *et al.* 2003). Sollte das Helix-Pore-Helix Motiv von Kcv auch für Kev zutreffen (was sehr wahrscheinlich ist, da die Kev-Pore in Kcv/(p)Kev funktional ist), dann könnten Veränderungen in der C-terminalen Helix leicht Einfluss auf die Struktur der Pore und damit auf die Leitfähigkeit haben. Ein vielversprechender Ansatz die Funktion von Kev wildtyp-Protein zu prüfen wäre sicherlich rekombinantes Kev-Protein in Lipid-Doppelschichten zu rekonstituieren um Einzelkanalmessungen in Membranen durchzuführen, deren Zusammensetzung durch den Experimentator bestimmt werden kann.

Die vorliegenden Daten sind im Zusammenhang mit der physiologischen Rolle von Kev interessant. Studien zum Aufbau von Ectocarpus siliculosus Virus haben ergeben, dass die interne Membran des Virus vom ER der Wirtszelle stammt (Wolf *et al.* 1998, Wolf 2000). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Ectocarpus fasciculatus Virus (EfasV-1), einem EsV-1 nahe verwandten Virus, war die Fusion der internen Virusmembran mit der Wirtszell-Plasmamembran während der Virusentfaltung (*uncoating*) an der Zelloberfläche zu beobachten (Van Etten *et al.* 2002). Sollte Kev eine ähnliche Funktion in der Membran des Virus haben wie sie oben für Kcv postuliert wurde, dann könnte eine kurze C-terminale Transmembranhelix für die Funktion ausreichen, da die ER-abgeleitete Virusmembran eine dünne Membran ist. Weitere Aussagen über die Funktion von Kev im Replikationszyklus von EsV-1 können derzeit nicht gemacht werden. Der längere cytoplasmatische N-Terminus von Kev bietet aber im Gegensatz zum kurzen N-Terminus von Kcv eine gute Voraussetzung zur Synthese Kev-spezifischer Antikörper und damit die Möglichkeit Immunlokalisationsstudien durchzuführen.

Die Entdeckung eines weiteren Kaliumkanals in der Familie der *Phycodnaviridae* ist schließlich auch aus der Sicht der Evolutionsbiologie bedeutungsvoll. Sequenzvergleiche von unterschiedlichen Genen (wie etwa DNA-Polymerasen oder Hyaluronansynthetasen) aus Viren, Bakterien, Archaeen und Eukaryonten haben gezeigt, dass die Gene der *Phycodnaviridae* an der Basis eines gemeinsamen Stammbaums zu finden sind (Villareal und DeFilippis 2000, Salzberg *et al.* 2001). Ein ähnliches Bild ergibt auch der phylogenetische Vergleich von Kaliumkanalgenen. Der viruskodierte Kaliumkanal Kcv erscheint hier ebenfalls als sehr basal (Plugge *et al.* 2000). Die Stellung der viralen Gene an der Basis eines gemeinsamen Stammbaums von Viren und lebenden Organismen führte zur Hypothese, dass Viren – besonders dsDNA-Viren wie die *Phycodnaviridae* - die ursprüngliche Quelle solcher Gene darstellen (Villarreal 1999). Sollte diese Hypothese zutreffen, dann blicken wir vielleicht in Kcv und Kev auf die Vorläufer der Kaliumkanäle, die heute in allen Lebensformen zu finden sind.



#### 4. ZUSAMMENFASSUNG

Viren der *Phycodnaviridae* haben eine komplexe Struktur mit einem eikosaedrischen Capsid, einer internen Membran und einem Nukleoproteinkern mit großem doppelsträngigen DNA-Genom (~300 kb). Phylogenetische Untersuchungen von Genen der *Phycodnaviridae* weisen auf eine lange evolutive Geschichte dieser Algenviren hin. Im Genom zweier entfernt verwandter *Phycodnaviridae* wurden Kaliumkanal-ähnliche Gene gefunden. Das Chlorellavirus PBCV-1 kodiert Kcv, den ersten bekannten viralen Kaliumkanal, dessen Funktionalität in heterologen Expressionssystemen gezeigt wurde (Plugge *et al.* 2000). Im Genom von *Ectocarpus siliculosus* Virus (EsV-1) kodiert das Offene Leseraster ORF 223 ein Protein, Kev, dessen Aminosäuresequenz hohe Homologie zum Kcv-Protein hat. Durch die heterologe Expression eines chimären Proteins aus Kcv mit der Pore von Kev konnte in dieser Arbeit die Funktionalität der Kev-Kanalpore gezeigt werden. Dennoch konnte durch die Expression des Kev-wildtyp-Proteins in Säugerzellen (HEK293 und CHO) oder in Oozyten von *Xenopus laevis* keine spezifische Kaliumkanalaktivität induziert werden. Die Kev-Expression führte lediglich zu einer nicht-selektiven Permeabilität der Plasmamembran. Als Ursache für die fehlende selektive Kanalaktivität kommt die Verteilung des Proteins in Zellen des heterologen Expressionssystems in Frage. Abhängig von der Länge der Carboxy-terminalen Transmembranhelix akkumulierte die Fluoreszenz von GFP-Fusionsproteinen von Kcv und Kev in HEK-Zellen in unterschiedlichen Strukturen. Mit einer Verlängerung der Carboxy-terminalen Helix von Kev-GFP-Fusionsprotein um drei oder sechs Aminosäurereste war dasselbe Verteilungsmuster wie mit Kcv-GFP-Fusionsprotein zu beobachten. Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche physiologische Rolle des Kev-Proteins in der dünnen Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) der Wirtszelle oder in der inneren Virusmembran von EsV-1 hin, welche vom ER des Wirts abgeleitet ist.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich außerdem Hinweise dafür, dass der Kaliumkanal Kcv aus PBCV-1 im Viruspartikel lokalisiert ist. Die Untersuchung der Transkription in infizierten *Chlorella* NC64A-Zellen ergab, dass *kcv*-mRNA in der späten Phase der Virusvermehrung synthetisiert wird, während der auch die Assemblierung viraler Partikel stattfindet. Weiter konnte mit dem spannungsabhängigen Fluoreszenzfarbstoff Bis-Oxonol eine Depolarisation des Membranpotentials bei der Infektion von *Chlorella* NC64A durch Chlorellaviren gemessen werden. Diese Depolarisation zeigte eine sehr ähnliche Pharmakologie wie die Replikation der Viren und die Kanalaktivität von Kcv in heterologen Expressionssystemen. Dies weist auf eine essentielle Funktion von Kcv während der ersten Minuten der Infektion durch Chlorellaviren hin.

## 5. MATERIAL UND METHODEN

### 5.1. Kultur von *Chlorella* NC64 und Reinigung der Chlorellaviren

#### *Algenkultur*

100 ml-Kulturen von *Chlorella* NC64A wurde in modifiziertem *Bold's Basal Medium* (MBBM, Nicols and Bold 1965) unter ständigem Schütteln bei 25°C unter Dauerlicht ( $\sim 30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inkubiert. MBBM (nach Meints *et al.* 1984) enthielt 3 mM  $\text{NaNO}_3$ , 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,3 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,43 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,43 mM  $\text{NaCl}$ , 0,13 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0,018 mM  $\text{FeSO}_4$ , 1g/l Bacto-Pepton und 5 g/l Saccharose. Steriles Tetracycline (10  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde nach dem Autoklavieren zugegeben.

#### *Aufreinigung von Chlorellaviren*

Zur Aufreinigung von Chlorellaviren wurden 400 ml einer Suspension von *Chlorella* NC64A ( $1,5 \cdot 10^7$  Zellen·ml<sup>-1</sup>) mit Virus bei einer m.o.i. von 0,01-0,001 infiziert und für 3-5 Tage unter Kulturbedingungen inkubiert. Alle darauf folgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Das Viruslysate wurde mit 4000xg zentrifugiert (Beckman J2-21, Rotor Ja20) und das Pellet anschließend verworfen. Chlorellaproteine im Lysat wurden von den Viren getrennt durch Solubilisierung mit 1% Triton X-100 und Zentrifugation für 60 min bei 20000rpm (Beckman L-70 Ultracentrifuge, Rotor Ti50.2), der Überstand wurde verworfen. Das Virus-Pellet wurde in 4 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) resuspendiert. Die Viruslösung wurde auf einen linearen Saccharosegradienten (100-400 mg/ml, in 50 mM Tris-HCl) aufgetragen und 20 min bei 20000rpm (Beckman L-70, Rotor SW28) zentrifugiert. Die Virusbande des Saccharose-Dichtegradienten wurde mit einer sterilen, gebogenen Injektionsnadel entnommen und die Viruslösung in 50 ml 50 mM Tris-HCl gelöst und anschließend für 3 Stunden zentrifugiert bei 27000rpm (Beckman L-70, Rotor Ti50.2). Das Viruspellet wurde dann in 2 ml 50 mM Tris-HCl resuspendiert.

Die Viren wurden filtriert (0,45  $\mu\text{m}$ -Filter, Sarstedt, Nürnberg) und bei 4°C gelagert. (Gefrieren führt bei Chlorellaviren zur Inaktivierung.)

#### *Bestimmung von Virustitern*

Virustiter wurden mit Chlorellavirus *plaque*-Tests (nach Van Etten *et al.* 1983) ermittelt. Die Viruskonzentrationen konnten zusätzlich am Photometer (Spectronic Genesys 5) mit der Absorption bei 260 nm abgeschätzt werden: 1 Absorptionseinheit  $A_{260\text{nm}}$  ergab typischerweise  $1,5\text{-}2,5 \cdot 10^{10}$  PFU (*Plaque forming units*).

## 5.2. Messungen mit spannungsabhängigem Fluoreszenzfarbstoff

*Chlorella* NC64A-Zellen ( $0,8-1,5 \cdot 10^7$  Zellen·ml<sup>-1</sup>) wurden während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet - die Infektion mit Chlorellaviren war bei Zellen aus dieser Phase am effizientesten.

Für Messungen von Änderungen des Membranpotentials von *Chlorella* NC64A mit Bis-Oxonol (DiSBAC<sub>2</sub>(3), Molecular Probes, Eugene, OR, USA) wurden  $7 \cdot 10^6$  Zellen (in 1780 µl MBBM) mit 1 µM Bis-Oxonol (20 µl einer 0,1 mM Bis-Oxonol-Lösung) und 100 µl einer Hemmstofflösung gemischt. In Kontrollmessungen wurde Hemmstoff durch Wasser ersetzt. Die Bis-Oxonol Fluoreszenz wurde bei  $540 \pm 5$  nm angeregt und die Emission bei  $560 \pm 10$  nm wurde für ca. 30 min (in Intervallen von 2 min) aufgezeichnet. Um Photobleichung zu vermindern wurde der Lichtweg zwischen einzelnen Messungen geschlossen. Nach 6-8 min Vorinkubation erreichte die Fluoreszenzemission ein Gleichgewicht und 100 µl einer Virussuspension (etwa  $7 \cdot 10^8$  PFU·ml<sup>-1</sup> PBCV-1 oder NY-2B) wurden zum Ansatz pipettiert. Alle Messungen wurden am Spektrofluorophotometer RF-5001 PC Version 2.00 (Shimadzu, Kyoto, Japan) durchgeführt.

## 5.3. Proteinbiochemische Methoden

### *Proteinbestimmung*

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen geschah nach der Methode von Popov *et al.* (1975).

### *Temperaturinduzierte Triton X-114 Zwei-Phasentrennung*

Zur Trennung von amphipathischen und hydrophilen Virusproteinen wurde die temperaturinduzierte Triton X-114 Zwei-Phasentrennung (Bordier 1981, Pryde 1986) angewendet. 125-500 µg Virusprotein wurde in 2% Triton X-114 30 min bei 4°C solubilisiert und nicht-solubilisierbare Proteine abzentrifugiert (10000xg, 15 min). Der Überstand wurde 5 min bei 25°C erwärmt, wobei Detergensmicellen zu einer Detergensphase aggregierten. Die Detergensphase (mit überwiegend hydrophoben Proteinen) wurde dann, unterstützt durch leichtes Zentrifugieren (1000xg, 2 min), von der wässrigen Phase (mit hydrophilen Proteinen) getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und durch ein gleiches Volumen 10 mM Tris-HCl (pH 7,8) ersetzt. Eine zweite Phasentrennung entfernte verbliebene hydrophile Proteine aus der Detergensphase.

### *SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)*

Die Gel-Elektrophorese wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Zur Denaturierung der Proben wurden Proteine in einem Probenpuffer aufgenommen und für 15 min bei RT inkubiert. Der Probenpuffer enthielt 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 8,7% Glycerin, 3% β-Mercaptoethanol, 2% SDS und 0,01% Bromphenolblau. Die Gel-Elektrophorese wurde in einer Mini-Protean II-Kammer (Bio-Rad, München) durchgeführt.

#### *Färbung von Polyacrylamidgelen*

Proteine auf Polyacrylamid (PA)-Gelen wurden mit der Silberfärbung nach Merril *et al.* (1981) oder mit Coomassie-Blau-Färbung nach Schlägger und Jargow (1987) sichtbar gemacht.

#### *MALDI-TOF*

Einzelne Coomassie-gefärbte Proteinbanden wurden von PA-Gelen auf einem Leuchttisch mit dem Skalpell ausgeschnitten. Trypsin-Hydrolyse und die anschließende *matrix assisted laser desorption/ionisation - time of flight* (MALDI-TOF) Analyse wurden mit  $\alpha$ -Cyanohydroxid-Zimtsäure als Matrixsubstanz von Firma Esplora (Darmstadt) ausgeführt.

Zur datenbankgestützten Analyse der Peptidmassen wurden die Programme Mascot Peptide-Fingerprint (Matrix Science) und Profound (Rockefeller Inst.) verwendet. Ein hypothetischer Trypsin-Verdau der Kcv-Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm PeptideMass (Expasy) ausgeführt.

### **5.4. Molekularbiologische Methoden**

#### *Bakterienstämme*

Die *E. coli*-Stämme DH-5 $\alpha$  und XLBlue1 wurden zur Klonierung von Plasmiden verwendet. Kulturmedium war LB-broth (5 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt), dem nach dem Autoklavieren gegebenenfalls Antibiotika nach den Angaben des Herstellers zugefügt wurde.

#### *Transformation von E. coli*

*Hitze-Schock Transformation chemisch kompetenter Zellen.* Plasmidkompetente *E. coli* Zellen wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan 1985) hergestellt. Zur Transformation wurden 250  $\mu$ l Zellsuspension mit 50-500 ng Plasmid-DNA 10 min auf Eis inkubiert, danach für 2 min bei 42°C erwärmt und wieder für 3 min auf Eis gehalten. Die Antibiotikaresistenz wurde für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln in 1 ml SOC-Medium (20 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Glucose) in Abwesenheit von Antibiotika exprimiert. 50-150  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurde auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

*Transformation durch Elektroporation.* Elektrokompetente *E. coli* Zellen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Zur Transformation wurden 40  $\mu$ l Zellsuspension mit 1  $\mu$ l (50-500 ng) Plasmid-DNA in Elektroporationsküvetten im Gene Pulser II (Bio-Rad) mit folgenden Parametern verwendet: 2,5 kV Vorspannung, 200  $\Omega$  Widerstand und 25  $\mu$ F Kapazität. Pulszeiten von 3-5 ms zeigten erfolgreiche Elektroporationen an. Nach der Transformation wurde 1 ml eiskaltes SOC-Medium zur Zellsuspension gegeben und dann für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 50-150  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurde auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### *Plasmidpräparationen*

Für Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab (bis 50  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA) wurde die Alkalische-Lyse Methode nach Sambrook *et al.* (1989) verwendet.

Größere Mengen Plasmid-DNA mit hoher Reinheit wurden mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach den Angaben des Herstellers aus 50 ml Bakteriensuspension gewonnen.

### *Standard-PCR*

Die Standardform der *polymerase chain reaction* (PCR) war ein 50  $\mu\text{l}$ -Ansatz mit 1-2  $\mu\text{l}$  *template*-DNA, 2  $\mu\text{l}$  eines dNTP-Mix (10 mM je dNTP), je 50 pmol eines Vorwärts- und eines Rückwärtsprimers, 5  $\mu\text{l}$  10xPolymerase-Puffer (Promega, Madison, WI, USA), 5 *units* Taq-DNA Polymerase (Promega). Standard-PCR-Programme enthielten 35 Zyklen mit 30 s bei 94°C (DNA-Denaturierung), 30 s bei 55-65°C (DNA-Hybridisierung) und 45-120 s bei 72°C (DNA-Verlängerung) und wurden mit dem Multi Cyclor PTC (MJ Research, Watertown, MA, USA) durchgeführt.

### *RNA-Isolierung aus PBCV-1-infizierten Chlorella NC64A-Zellen*

Zur Untersuchung der Transkription wurden *Chlorella* NC64A-Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase ( $\sim 1,5 \cdot 10^7$  Zellen·ml<sup>-1</sup>) verwendet.

Kleinere Mengen (bis 20  $\mu\text{g}$ ) DNA-freier RNA (beispielsweise zur cDNA-Synthese) wurden mit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) und RNase-Free DNase Set (Quiagen) aus PBCV-1-infizierter *Chlorella* NC64A gewonnen. Dazu wurden  $1,5 \cdot 10^7$  Zellen *Chlorella* NC64A mit PBCV-1 bei einer m.o.i. von 5 infiziert. Infizierte Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (15-240 min p.i.) durch Zentrifugation (5 min, 5000xg bei 4°C) geerntet und der Überstand verworfen. Die Infektion wurde durch die Zugabe von Flüssigstickstoff zum Algen-Pellet gestoppt. Die Algenzellen wurden mit RNase-freiem Mörser und Pistill (bei 4°C) aufgebrochen und die RNA nach den Angaben des Qiagen Handbuchs aufgereinigt.

Zur Aufreinigung größere Mengen von RNA aus infizierten *Chlorella* NC64A (z.B. für Northern-Hybridisierungen) wurde das TRIzol-Reagens (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Dazu wurden  $3 \cdot 10^9$  Zellen *Chlorella* NC64A bei m.o.i. 5 mit PBCV-1 infiziert und nach 15-240 min p.i. durch Zentrifugation geerntet (5 min, 5000xg bei 4°C). Die Zellen aus dem Pellet dieser Zentrifugation wurde ebenfalls mit Flüssigstickstoff eingefroren und 1 ml TRIzol-Reagens dazu pipettiert. Die Algen wurden dann aufgebrochen durch heftiges Vortexen (5 min) in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit 250 mg RNase-freien Glasperlen (0,25-0,3 mm Durchmesser). Die weitere RNA-Aufreinigung wurden nach der TRIzol Gebrauchsanweisung ausgeführt.

### *RACE-PCR*

Zur Sequenzierung von mRNA aus der frühen und späten viralen Replikationsphase wurden verschiedene Versionen der *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) – PCR eingesetzt.

In einer einfachen Version dieser Methode (5' RACE System, Invitrogen) wurde nach den Angaben in der Gebrauchsanweisung RNA mit dem genspezifischen Primer 5' CGCCG GTCGTCTTTGGCAGTATATCTC 3' in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Die 5'-Enden der cDNA wurde dann mit einem poly(C)-Schwanz verlängert und in einer nachfolgenden PCR mit einem poly(G)-Adapter-Primer und einem zweiten genspezifischen Primer 5' ACAGTACTGTGTGTCGTAC 3' amplifiziert. Schließlich wurde noch eine

innere (*nested*) PCR mit einem Adapter-Primer und einem dritten genspezifischen Primer 5'AGAGTACTTATTTTCGAACC 3' durchgeführt.

Eine weiter entwickelte Form der 5' RACE-PCR wurde benutzt um selektiv nur solche RNA-Spezies zu amplifizieren, die ein Methylguanosin-Cap am 5'-Ende tragen. Dazu wurde das FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion, Austin, TX, USA) nach den Angaben im Handbuch verwendet. Die Behandlung von gesamt-RNA mit *calf intestine phosphatase* (CIP) entfernt freie 5'-Phosphatreste von Molekülen wie rRNA, tRNA und fragmentierter RNA. Die Cap-Struktur am 5'-Ende intakter mRNA wird von der CIP nicht angegriffen. Durch die anschließende Behandlung mit der Sauren Phosphatase aus Tabak (TAP) wird die Cap-Struktur von mRNA entfernt, wobei ein Monophosphatrest am 5'-Ende erhalten bleibt. Nur an solche RNA kann danach ein RNA-Adapter-Oligonukleotid mit der T4 RNA-Ligase ligiert werden. Die so vorbehandelte RNA wird dann mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit einem Adapter-spezifischen Primern des Kits und dem genspezifischen Primer 5' TCATAAAGTTAGAACGATG 3' wurde in einer nachfolgenden PCR nur von *kcv*-cDNA amplifiziert, deren mRNA ursprünglich mit einem Methylguanosin-Cap ausgestattet war.

3' RACE-Experimente wurden mit dem FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion) nach den Angaben im Handbuch durchgeführt. Der genspezifischen Primer für die 3' RACE-PCR war 5' ATGTTAGTGTTCAGTAAATTTC 3'.

PCR-Produkte aus den RACE-Experimenten wurden durch TA-Klonierung in einen modifizierten pBluescript-Vektor (Borokov und Rivikin 1996) ligiert und mit Primern gegen die T7- oder T3-Promoterregion des Vektors sequenziert. Alternativ wurden DNA-Banden von Agarosegelen extrahiert und mit einem genspezifischen Primer sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von Firma Seqlab, Göttingen durchgeführt.

### *Northern-Hybridisierung*

Je 6 µg RNA-Proben, isoliert aus nicht infizierten und 15–240 min infizierten *Chlorella* NC64A-Zellen wurden mit 10 µl Denaturierungspuffer gemischt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Der Denaturierungspuffer enthielt 300 µl Formamid, 98 µl Formaldehyd und 60 µl MOPS-Pufferlösung (40 mM MOPS, 10 mM Na-Acetat, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt). Die RNA wurde dann mit einem denaturierenden 1,2%-Agarosegel aufgetrennt, durch Northern-*blot* auf eine Nylonmembran (Micron Separations Inc., Westborough, MA, USA) übertragen (nach Schuster *et al.* 1990) und durch 200 mJoule UV-Licht (Stratalinker UV 2400 Crosslinker, Stratagene, La Jolla, CA, USA) mit der Nylonmembran vernetzt.

Zur Herstellung einzelsträngiger DNA-Sonden wurde ein Plasmid (pBluescript) mit dem zu untersuchenden Gen am 5'-Ende des Inserts mit einem Restriktionsenzym linearisiert und bei 95°C für 5 min denaturiert. In einer Synthesereaktion (40 µl) wurden folgende Bestandteile für 1 Stunde bei RT inkubiert: 25 ng Plasmid-DNA, 5 µl Klenow-10xPuffer (NEB), 50 pmol eines genspezifischen *antisense* Primers, 2 µl dNTP-mix (0,5 mM) ohne dATP, 3 µl <sup>32</sup>P-dATP (30 µCi) und 1 µl (5 Units) Klenow-Fragment (NEB). Die Synthese wurde durch die Zugabe von 5 µl Na<sub>2</sub>EDTA (300 mM) gestoppt, die Sonde anschließend 5 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die genspezifischen Primer zur Synthese der Sonden waren (i) 5' AGTGGTATCATCAAACATG 3' gegen ORF a248r, (ii) 5' TCATAAAGTTAGAACGATG 3' gegen ORF a250r und (iii) 5' GTTGCCTCCTCGTTGAACG 3' gegen ORF a251r.

Die RNA auf der Nylon-Membran wurde 16 Stunden bei 65°C in 50 mM NaPO<sub>4</sub>, 1% BSA, und 2% SDS mit der <sup>32</sup>P-markierten Sonde hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die membrangebundene Radioaktivität mit einem Storm 840 Phosphorimager und Image Quant Software (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA, USA) detektiert.

### *Konstruktion von Expressionsvektoren*

ORF 223 (Kev) wurde mit PCR aus genomischer DNA von EsV-1 (freundlicherweise von N. Delaroque, Max Planck Institut für Chemische Ökologie, Jena, zur Verfügung gestellt) amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer mit BamHI und XbaI-Schnittstellen verwendet: 5'TAGGGATCCATGTCCCGGCGACTGTTTGCGACT 3' und 5' TAATCTAGACTACTTC TCGAGAGCCTTCGCGAC 3'. Das PCR-Produkt wurde mit den beiden entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in zuvor ebenso verdauten Expressionsvektor für Säugerzellen pcDNA3.1 (Invitrogen, Groningen, Niederlande) ligiert.

Zur Konstruktion eines Expressionsvektors für *Xenopus laevis* Oozyten wurde das Konstrukt Kev-pcDNA3.1 mit den Restriktionsenzymen BamHI und Bsp120I verdaut. Das Kev-haltige DNA-Fragment wurde von einem Agarosegel extrahiert und in den zuvor ebenso verdauten Vektor pSGEM ligiert. pSGEM ist ein modifizierter pGEM-HE Expressionsvektor für *Xenopus* Oozyten, der freundlicherweise von M. Hollmann, Max Planck Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) zur Verfügung gestellt wurde.

### *Konstruktion von GFP-Fusionsproteinen*

Für die Fusion von Kev mit dem Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) wurde das ORF 223 aus genomischer DNA von EsV-1 in einer PCR mit den folgenden Primern amplifiziert: 5' TG AAGATCTATGTCCCGGCGACTGTTTGCG 3' und 5' TAAGAATTCCTTCTCGAGAG CCTTCGCGAC 3'. Die Primer fügten (5') BglII und (3') EcoRI Restriktionsschnittstellen ein, außerdem wurde durch den Revers-Primer das Stopp-Codon von *kev* eliminiert. Das PCR-Produkt wurde in den vorher verdauten Säugerzell-Expressionsvektor pEGFP (Clontech, Palo Alto, CA, USA) in das Leseraster, stromaufwärts des GFP-Gens ligiert.

Zur Insertion von 9 Nukleotiden für die Konstruktion der Kev-Mutanten F113IVL::GFP wurde das QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. In dieser PCR-basierten Methode wurde das Konstrukt Kev-pEGFP als Template zusammen mit den folgenden Mutagenese-Primern eingesetzt: 5' GCATGTTCTTCGTATTGTTCTGATGC TCCCCGTTGTC 3' und 5' GACAACGGGGAGCATCAGAACAATCACGAAGAACATG GC 3'.

Für die Konstruktion der Kev-Mutante F113IVLIVL::GFP wurden 9 weitere Nukleotide in das vorher angefertigte Konstrukt F113IVL::GFP eingefügt. Das Stratagene-Kit wurde dazu mit den folgenden Mutagenese-Primern verwendet 5' ATGTTCTTCGTGATTGTTCTG ATTGTTCTGATGCTCCCCGTT 3' und 5' AACGGGGAGCATCAGAACAATCAGAAC AATCACGAAGAACAT 3'.

Das Kev-GFP-Fusionsprotein wurde wie folgt entwickelt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde PBCV-1 von einem einzelnen *plaque* auf einer Platte mit infizierter *Chlorella* NC64A gepickt (der PBCV-1-*plaque*-Test ist in Van Etten *et al.* 1982 beschrieben), in 100 µl 50 mM Tris·HCl (pH 7,8) aufgenommen und für 10 min gekocht. In einer PCR wurde aus diesem Material (2 µl) das *kcv*-Gen amplifiziert mit den Primern 5' TTAAAGATCTATGTTAGT GTTTAGTAAATTTCTAACGC 3' and 5' ATATGGATCCTAAAGTTAGAACGATGA AGAAC 3'. Damit wurden (5') BglII und (3') BamHI Restriktionsschnittstellen angefügt und das *kcv*-Stoppodon eliminiert. Das PCR-Produkt wurde im Leseraster, stromaufwärts vom GFP-Gen in den Expressionsvektor pEGFP kloniert, wozu die BglII und BamHI Schnittstellen der *multiple cloning site* des Vektors benutzt wurden.

Für die Konstruktion des chimären Proteins Kcv/(p)Kev wurde die Porenregion des *kev*-Gens in einer PCR mit den folgenden Primern aus dem vorher hergestellten Vektor Kev-pcDNA3.1 amplifiziert: 5' ATTACCCGGGAGGGTTCGACCAAGGGGATGATCAC 3' und 5' ATATAAGCTTTGCGCCGGTCGTCAATTTTGCCTTCGGAGTTTTCGG 3'. Damit

wurden auch (5') XmaI und (3') HindIII Restriktionsschnittstellen angefügt. Das PCR-Produkt wurde mit den beiden Restriktionsenzymen verdaut und in das Plasmid Kcv-pEGFP ligiert, aus dem vorher mit den XmaI und HindIII des *kcv*-Gens die Kcv-Pore ausgeschnitten worden war.

Die DNA-Sequenzen aller Konstrukte wurden kontrolliert. Die Sequenzierungen dazu wurden von der Firma Seqlab, Göttingen durchgeführt.

### *Expression von Kev und chimären Proteinen*

Kev-cRNA wurde in einer T7 Polymerase *in-vitro*-Transkription (Riboprobe, Promega, Madison, WI, USA) vom Plasmid Kev-pSGEM synthetisiert und 25-50 µg cRNA je Zelle in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Die Oozyten waren zuvor nach einer Standardmethode präpariert worden (Plugge *et al.* 2000). Messungen wurden 2-4 Tage nach der Injektion durchgeführt.

HEK293-Zellen wurden zu 40-60% konfluent auf 35 mm Kulturschälchen anwachsen lassen und nach den Angaben der Gebrauchsanleitung mit Metafectene™ Transfektionsreagens (Biontex, München) und 1,5 µg Plasmid-DNA (Kev-pcDNA3.1, Kcv/(p)Kev-pEGFP, F113IVL-pEGFP oder F113IVLIVL-pEGFP) transient transfiziert. Kontrollzellen wurden mit Plasmid transfiziert, das nur das GFP-Gen enthielt. Die Zellen wurden dann für 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit frischem Medium versorgt (DMEM/HAM's F12 mit 2 mM Glutamin, Sigma, Taufkirchen).

### **5.5. Confokalmikroskopie**

Die Fluoreszenz von HEK293-Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion detektiert mit einem Leica TCS Spektral Confokalmikroskop, ausgerüstet mit einem Argon-Krypton-Laser (Leica Microsystems Heidelberg GmbH). Bilder wurden mit einem HCX PL APO 63x/1,2 NA Objektiv aufgenommen. EGFP wurde mit der Argon-Laserlinie (488 nm) angeregt und die Emission confokaler Schnitte bei 505-555 nm gesammelt.

### **5.6. Elektrophysiologie**

Zur Messung von Strömen an *Xenopus laevis* Oozyten wurde eine Zwei-Elektroden *voltage-clamp* Messsystem (Gene clamp 500, Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Die Elektroden waren mit 0,3 M KCl befüllt und hatten in 50 mM KCl Widerstände von 0,5-0,8 MΩ. Die Zellen wurden in der Messkammer bei einer Durchflussrate von 2 ml·min<sup>-1</sup> mit Standard- Badlösung umspült, die 50 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM Hepes (mit KOH auf pH 7,4 eingestellt) enthielt. Die Osmolarität dieser Lösung war mit Mannitol auf 215 mosm eingestellt worden. Das Standard Spannungsprotokoll bestand aus Schritten von der Haltespannung -20 mV nach Testspannungen zwischen +60 mV bis -120 mV, gefolgt von einem Spannungsschritt auf -80 mV. Instantane Ströme wurden nach 5 ms aufgenommen, stationäre Ströme waren gemittelten Werte aus 50 ms am Ende eines Spannungspulses (üblicherweise 600 ms).



Experimente an HEK293-Zellen wurden an Zellen durchgeführt, die 2-3 Tage nach der Transfektion bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Am Tag des Experiments wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (Fisher Scientific, Schwerte) von den Kulturschälchen abgelöst, zu einer geringen Zelldichte auf Kulturschälchen ausplattiert und für 3-4 Stunden anwachsen lassen. Messungen wurden an so vereinzelter Zellen im Ganzzell-Modus einer Standard *patch-clamp*-Technik (Hamill *et al.* 1981) mit einem EPC-9 Verstärker (HEKA, Lambrecht) durchgeführt. Die Aufnahme und Analyse der *patch-clamp*-Daten geschah mit Puls/Pulsfit Software (HEKA). Ganzzellströme wurden angeregt durch 600 ms-Spannungspulse zwischen +80 mV und -160 mV, die in Intervallen von 1,5 s von einer Haltespannung 0 mV gegeben wurden. Die Ströme wurden mit einer Rate von 4 kHz aufgezeichnet und ohne die Subtraktion von Leckströmen analysiert. Die Zellen wurden bei RT (2 ml·min<sup>-1</sup>) mit einer Badlösung umspült, die 100 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Hepes (pH 7,4) und 60 mM Cholin-Cl enthielt. Die Osmolarität von Badlösungen mit abweichenden Konzentrationen wurde mit Cholin-Cl auf 290 mosm eingestellt. Die Pipetten für Messelektroden waren befüllt mit 10 mM NaCl, 130 mM KCl, 1 mM EGTA, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 0,1 mM GTP, 5 mM Phosphocreatin und 5 mM Hepes-KOH (pH 7,2).

### 5.7. Verwendete Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien in p.a.-Qualität von AppliChem (Darmstadt), Sigma, Aldrich (Seelze) Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen.

Restriktionsendonukleasen waren von New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

Für PCR wurden *Taq* DNA-Polymerase und dNTPs von Promega (Mannheim) verwendet.

Oligonukleotide wurden von Sigma Genosys (Haverhill, UK) synthetisiert.

### 5.8. Software, Internetadressen und GenBank Nummern

Zur Auswertung und Analyse von Daten wurden Excel (X für Mac, Microsoft) und Igor Pro Version 5.01 (WaveMetrics) benutzt.

Folgende Programme sind über das Internet frei verfügbar:

TMHMM2.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM</a>
TMpred	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>
Mascot – Peptide Fingerprint	<a href="http://www.matrixscience.com">http://www.matrixscience.com</a>
Profound	<a href="http://prowl.rockefeller.edu">http://prowl.rockefeller.edu</a>
PeptideMass	<a href="http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html">http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html</a>

Datenbanken:

NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
ICTVdB	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm</a>

Das Genom von Ectocarpus siliculosus Virus (EsV-1) ist unter der GenBank Nummer NC\_002687 eingetragen. Die Sequenz von ORF 223 (*kev*) ist unter AAK14637 zu finden.

Das Paramecium bursaria Chlorellavirus (PBCV-1)-Genom ist unter NC\_000582 eingetragen. Die Sequenz von ORF a250r (*kcv*) hat die Zugangsnummer AY3382212.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) Molecular biology of the cell. 3. Aufl., Garland Publishing, New York, London
- Barbier-Brygoo H, Vinauger M, Colcombet J, Ephritikhine G, Franchisse J, Maurel C (2000) Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 199-218
- Beilby MJ, Walker NA (1996) Modeling the current-voltage characteristics of Chara membranes: I. the effect of ATP removal and zero turgor. *J. Memb. Biol.* 149, 89-101
- Birnboim HC, Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7, 1513-1523
- Blanco R, Carrasco L, Ventoso I (2003) Cell killing by HIV-1 protease. *J. Biol. Chem.* 278, 1086-1093
- Bordier (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256, 1604-1607
- Borokov AY, Rivkin MI (1997) XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products. *BioTechniques* 22, 812-814
- Boulanger P, Lettelier L (1988) Characterisation of ion channels involved in the penetration of phage T4 DNA into Escherichia coli cells. *J. Biol. Chem.* 263, 9767-9775
- Boulanger P, Lettelier L (1992) Ion channels are likely to be involved in the two steps of phage T5 DNA penetration into Escherichia coli cells. *J. Biol. Chem.* 267, 3168-3172
- Brandizzi F, Frangne N, Marc-Martin S, Hawes C, Neuhaus JM, Paris N (2002) The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell* 14, 1077-92
- Carrasco (1995) Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adva. Virus Res.* 45, 61-112
- Chang YS, Liao CL, Tsao CH, Chen MC, Liu CI, Chen LK, Lin YL (1999) Membrane permeabilization by small hydrophobic nonstructural proteins of Japanese encephalitis virus. *J. Virol.* 73, 6257-6264
- Chase TE, Nelson JA, Burbank DE, Van Etten JL (1989) Mutual exclusion occurs in a chlorella-like green alga inoculated with two viruses. *J. Gen. Virol.* 70, 1829-1836
- Chen F, Suttle CA (1996) Evolutionary relationships among large double-stranded DNA viruses that infect microalgae and other organisms as inferred from DNA polymerase genes. *Virology* 219, 170-178
- Chen MY, Malarelli F, Karczewski MK, Willey RL, Strebel K (1993) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *J. Virol.* 67, 3877-3884
- Coady MJ, Daniel NG, Tiganos E, Allain B, Friberg J Lapointe JY, Cohen EA (1998) Effects of Vpu expression on Xenopus oocyte membrane conductance. *Virology* 244, 39-49

- Comardelle AM, Norris CH, Plymale DR, Gatti PJ, Choi B, Fermin CD, Haislip AM, Tencza SB, Mietzner TA, Montelaro RC, Garry RF (1997) A synthetic peptide corresponding to the carboxy terminus of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein induces alterations in the ionic permeability of *Xenopus laevis* oocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13, 1525-1532
- Condit RC, Niles EG (2002) Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochim. Biophys. Acta* 1577, 325-336
- Daugelavicius R, Bamford JKH, Bamford DH (1997) Changes in host cell energetics in response to bacteriophage PRD1 DNA entry. *J. Bacteriology* 179, 5203-5210
- Delaroque N, Maier I, Knippers R, Müller DG (1999) Persistent virus integration into the genome of its algal host, *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *J. Gen. Virol.* 80, 1367-1370
- Delaroque N, Müller DG, Bothe G, Pohl T, Knippers R, Boland W (2001) The complete DNA sequence of the *Ectocarpus siliculosus* virus EsV-1 genome. *Virology* 287, 112-132
- DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C (1986) Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.* 377, 61-88
- Dong Y, Zeng CQ, Ball JM, Estes MK, Morris AP (1997) The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3960-3965
- Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280, 69-77
- Ellgaard L, Molinari M, Helenius A (1999) Setting the standards: quality control in the secondary pathway. *Science* 286, 1882-1888
- Engelman DM, Steitz TA, Goldman A (1986) Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15, 321-53
- Epps DE, Wolfe ML, Groppi V (1994) Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (Dibac4(3)) in model systems and cells. *Chem. Phys. Lipids* 69, 137-150
- Fischer WB, Sansom MSP (2002) Viral ion channels: structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1561, 27-45
- Fuhrman JA (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399, 541-548
- Gazzarrini S, Severino M, Lombardi M, Morandi M, DiFrancesco D, Van Etten JL, Thiel G, Moroni A (2003) The viral potassium channel Kcv: structural and functional features. *FEBS Lett.* 552, 12-16
- Gonzales ME, Carrasco L (2003) Viroporins. *FEBS Lett.* 552, 28-34
- Goodwin TW, Mercer EI (1983) Introduction to plant biochemistry. Pergamon, Oxford, UK
- Griffith LC (2001) Potassium channels: The importance of transport signals. *Current Biology* 11, 226-228

- Grinius L, Daugelavicius R (1988) Depolarization of Escherichia coli cytoplasmic membrane by bacteriophage T4 and lambda: evidence for induction of ion-permeable channels. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 19, 235-245
- Hammil OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100
- Hanahan D (1985) In: DNA Cloning, D.Glover (Editor). IRL Press, Ltd., London
- Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, Hedges SB (2001) Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293, 1129-1133
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R (1994) Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.* 66, 1061-1067
- Heginbotham L, Odessey E, Miller C (1997) Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K<sup>+</sup> channel. *Biochemistry* 36, 10335-10342
- Hille B (2001) Ion channels of excitable membranes. 3. Aufl., Sinauer Associates Inc., Sunderland
- Hofmann HJ, Hodge D (1987) On the theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Biomed. Biochim. Acta* 46, 855-66
- Hopkins CR (1992) Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. *Trends Biochem. Sci.* 17, 27-32
- Hopp TP, Woods KR (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3824-3828
- Hoth S, Geiger D, Becker D, Hedrich R (2001) The pore of plant K(+) channels is involved in voltage and pH sensing: domain-swapping between different K(+) channel alpha-subunits. *Plant Cell* 13, 943-52
- Jiang B, Sun X, Cao K, Wang R (2001) Endogenous Kv channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Mol. Cell. Biochem.* 238, 69-79
- Kang M, Moroni A, Gazzarrini S, DiFrancesco D, Thiel G, Severino M, Van Etten JL (2004) Small potassium ion channel proteins encoded by chlorella viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press)
- Kapp M (1998) Viruses infecting marine brown algae. *Virus Genes* 16, 111-117
- Kawakami H, Kawakami N (1978) Behavior of a virus in a symbiotic system, *Paramecium bursaria-zoochlorella*. *J. Protozool.* 25, 217-225
- Keilmann B (2003) Versuch zur Selektion von Hemmstoff-resistenten Kaliumkanal-Mutanten aus dem Virus PBCV-1. Diplomarbeit an der Technischen Universität Darmstadt
- Kelly ML, Cook JA, Brown-Augsburger P, Heinz BA, Smith MC, Pinto LH (2003) Demonstrating the intrinsic ion channel activity of virally encoded proteins. *FEBS Lett.* 552, 61-67
- Kim YJ, Freas A, Fenselau C (2001) Analysis of viral glycoproteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 73, 1544-1548
- Komor E, Tanner W (1967) The determination of the membrane potential of *Chlorella vulgaris*. Evidence for electrogenic sugar transport. *Eur. J. Biochem.* 70, 197-204

- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EEL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markow model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567-580
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahmann T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300, 1922-1926
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lamb RA, Pinto LH (1997) Do Vpu and Vpr of human immunodeficiency virus type 1 and NB of influenza B virus have ion channel activities in the viral life cycles? *Virology* 229, 1-11
- Lehmann WD (1996) Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford
- Lettelier L, Boulanger P, de Frutos M, Jacquot P (2003) Channeling phage DNA through membranes: from in vivo to in vitro. *Res. Microbiol.* 154, 283-287
- Lu Z, Klem AM, Ramu Y (2001) Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413, 809-813
- Lüttge U (1985) Stoffaufnahme, Carriermechanismen und Transport in Pflanzen. In: Physiologische Schlüsselprozesse in Pflanze und Insekt, Herausgeber Böger P. Universitätsverlag Konstanz
- Ma D, Jan LY (2002) ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr. Opin. in Neurobiol.* 12, 287-292
- MacKinnon R (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555, 62-65
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1997) Brock Biology of Microorganisms, 8. Aufl., Prentice Hall Internat., London
- Martin K, Helenius A (1991) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67, 117-130
- Mehmel M, Rothermel M, Meckel T, Van Etten JL, Moroni A, Thiel G (2003) Possible function for virus encoded K<sup>+</sup> channel Kcv in the replication of chlorella virus PBCV-1. *FEBS Lett.* 552, 7-11
- Meints RH, Burbank DE, Van Etten, Lampion DT (1988) Properties of the Chlorella receptor for the virus PBCV-1. *Virology* 164, 15-21
- Meints RH, Lee K, Van Etten JL (1986) Assembly site of the virus PBCV-1 in a Chlorella-like green alga: ultrastructural studies. *Virology* 154, 240-245
- Meints RH, Lee K, Burbank DE, Van Etten JL (1984) Infection of a Chlorella-like alga with the virus, PBCV-1: ultrastructural studies. *Virology* 138, 341-346
- Merril CR, Dunau ML, Goldmann D (1981) A rapid silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 110, 201-207
- Milligan KLD, Coper EM (1994) Isolation of virus capable of lysing the brown tide microalga, *Aureococcus anophagefferens*. *Science* 266, 805-807

- Minor DL, Masseling SJ, Jan YN, Jan LY (1999) Transmembrane structure of an inwardly rectifying potassium channel. *Cell* 96, 879-891
- Möller S, Croning MDR, Apweiler (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17, 646-653
- Moroni A, Viscomi C, Sangiorgio V, Pagliuca C, Meckel T, Horvath F, Gazzarrini S, Valbuzzi P, Van Etten JL, DiFrancesco D, Thiel G (2002) The short N-terminus is required for functional expression of the virus-encoded miniature K<sup>+</sup> channel Kcv. *FEBS Lett.* 530, 65-69
- Müller DG, Kapp M, Knippers R (1998) Viruses in marine brown algae. In: Maramorosch K, Murphy FA, Shatkin AJ (Editoren) *Advances in virus research*, vol 50. Academic Press, NewYork, 49 -67
- Nicols HW, Bold MC (1965) *J. Phycol.* 1, 34
- Parker I, Ivorra I (1990) A slowly inactivating potassium current in native oocytes of *Xenopus laevis*. *Proc. R. Soc. Lond.* 238, 369-381
- Pedrazzini E, Villa A, Borgese N (1996) A mutant cytochrome b(5) with a lengthened membrane anchor escapes from the endoplasmic reticulum and reaches the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4207-4212
- Piller SC, Jans P, Gage PW, Jans DA (1998) Extracellular HIV-1 virus protein R causes a large inward current and cell death in cultured hippocampal neurons: implications for AIDS pathology. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 4595-4600
- Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69, 517-528
- Plugge B, Gazzarrini S, Nelson M, Cerana R, Van Etten JL, Derst C, DiFrancesco D, Moroni A, Thiel G (2000) A potassium channel protein encoded by chlorella virus PBCV-1. *Science* 287, 1641-1644
- Pryde JG, Philips JH (1986) Fractionation of membrane proteins by temperature-induced phase separation in Triton-X 114. *Biochem. J.* 233, 525-533
- Ptashne M (1989) *Genregulation. Der biologische Schalter bei Phage λ*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Que Q, Van Etten JL (1995) Characterization of a protein kinase gene from two chlorella viruses. *Virus Res.* 35, 291-305
- Rayner JC, Pelham HRB (1997) Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *EMBO J.* 16, 1832-1841
- Reanney (1974) *Viruses and evolution. Int. Rev. Cytol.* 37, 21-52
- Reisser W, Burbank DE, Meint SM, Meints RH, Becker B, VanEtten JL (1988) A comparison of viruses infecting two different Chlorella-like green algae. *Virology* 167, 143-149
- Salzberg LS, White O, Peterson J, Eisen JA (2001) Microbial genes in the human genome: lateral transfer or gene loss? *Science* 292, 1903-1906
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. 2. Aufl.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sansom MSP, Shrivastavab IH, Bright JN, Tatec J, Capener CE, Biggina PC (2002) Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochim. Biophys. Acta* 1565, 294-307

- Schlägger H, Jargow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analyt. Biochem.* 166, 368-379
- Schroeder DC, Oke J, Malin G, Wilson (2002) Coccolithovirus (Phycodnaviridae): Characterisation of a new large dsDNA algal virus that infects *Emiliania huxleyi*. *Arch. Virol* 147, 1685-1698
- Schubert U, Ferrer-Montiel AV, Oblatt-Montal M, Henklein P, Strebel K, Montal M (1996) Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Lett.* 398, 12-18
- Schuster AM, Girton L, Burbank DE, Van Etten JL (1986) Infection of a *Chlorella*-like alga with the virus PBCV-1: Transcriptional studies. *Virology* 148, 181-189
- Schuster AM, Graves M, Korth K, Ziegelbein M, Brumbaugh J, Grone D, Meints RH (1990) Transcription and sequence studies of a 4.3 kbp fragment from a dsDNA eukaryotic algal virus. *Virology* 176, 515-523
- Shimbo K, Brassard DL, Lamb RA, Pinto L (1995) Viral and cellular small integral membrane proteins can modify ion channels endogenous to *Xenopus* oocytes. *Biophys J.* 69, 1819-29
- Skrdla MP, Burbank DE, Xia Y, Meints RH, Van Etten JL (1984) Structural proteins and lipids in a virus, PBCV-1, which replicates in a *Chlorella*-like alga. *Virology* 135, 308-315
- Sonnhammer ELL, von Heijne G, Krogh A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 175-182. AAAI Press
- Sugrue RJ, Bahadur G, Zambon MC, Hall-Smith M, Douglas AR, Hay AJ (1990) Specific structural alteration of the influenza haemagglutinin by amantadine. *EMBO J.* 9, 3469-3476
- Sun L, Adams B, Gurnon JR, Ye Y, Van Etten JL (1999) Characterization of two chitinase genes and one chitosanase gene encoded by *chlorella* virus PBCV-1. *Virology* 263, 376-387
- Tarutani K, Nagasaki K, Yamaguchi M (2000) Viral impacts on total abundance and clonal composition of the harmful bloom-forming phytoplankton *Heterosigma akashivo*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4916-4920
- Thiel G, Lynch J, Läuchli A (1988) Short-term effects of salinity stress on the turgor and elongation of growing barley leaves. *J. Plant Physiol.* 132, 38-44
- van den Hoek C, Jahns HM, Mann DG (1993) *Algen*. 3. Aufl., Thieme, Stuttgart
- Van Etten (2000) Phycodnaviridae. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGoech DJ, Pringle CR, Wickner RB (Editoren) *Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses*, seventh report. Academic Press, San Diego, 183-193
- Van Etten JL (2003) Unusual life style of giant *chlorella* viruses. *Annu. Rev. Genetics* 37, 153-195
- Van Etten JL, Burbank DE, Joshi J, Meints RH (1984) DNA synthesis in a *chlorella*-like alga following infection with the virus PBCV-1. *Virology* 134, 443-449
- Van Etten JL, Burbank DE, Kuczmarski D, Meints RH (1983) Virus infection of culturable *chlorella*-like algae and development of a plaque assay. *Science* 219, 994-996

- Van Etten JL, Burbank DE, Xia Y, Meints RH (1983) Growth cycle of a virus, PBCV-1, that infects chlorella-like algae. *Virology* 126, 117-125
- Van Etten JL, Graves MV, Müller DG, Boland W, Delaroque N (2002) Phycodnaviridae – large DNA algal viruses. *Arch. Virol.* 147, 1479-1516
- Van Etten JL, Lane LC, Meints RH (1991) Viruses and viruslike particles of eukaryotic algae. *Microbiol. Rev.* 55, 586-620
- Van Etten JL, Meints RH (1999) Giant viruses infecting algae. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 447-494
- Van Etten JL, Meints RH, Burbank DE, Kuczmarski D, Cupples DA, Lane LC (1981) Isolation and characterization of a virus from the intracellular green algae symbiotic with *Hydra viridis*. *Virology* 113, 704-711
- Villarreal LP (1999) DNA viruses: their influence on host evolution. In *Origin and Evolution of Viruses*. Domingo E, Webster R, Holland JJ, Pickett T (Editoren). 391-410
- Villarreal LP, DeFilippis VR (2000) A hypothesis for DNA viruses as the origin of eukaryotic replication proteins. *J. Virol.* 74, 7079-7084
- Wolf S (2000) Ultrastructural studies on the assembly of brown algal viruses. Dissertation an der Universität Konstanz
- Wolf S, Maier I, Katsaros C, Müller DG (1998) Virus assembly in *Hincksia hincksiae* (Ectocarpales, Phaeophyceae). An electron and fluorescence microscopic study. *Protoplasma* 203, 153-167
- Yamada T, Hiramatsu S, Songsri P, Fujie M (1997) Alternative expression of a chitosanase gene produces two different proteins in cells infected with chlorella virus CVK2. *Virology* 230, 361-368
- Yan X, Olson JL, Van Etten JL, Bergoin M, Rossmann MG, Baker TS (2000) Structure and assembly of large lipid-containing dsDNA viruses. *Nature Struct. Biol.* 7, 101-103
- Yu SP, Kerchner GA (1998) Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J. Neurosci. Res.* 52, 612-617
- Zhang Y, Nelson M, Nietfeldt JW, Burbank DE, Van Etten JL (1992) Characterization of chlorella virus PBCV-1 CviAII restriction and modification system. *Nucleic Acids Res.* 20, 5351-5356



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Absorption
A	Adenin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Carboxy
C	Cytosin
cDNA	<i>copy DNA</i>
CHO-K1	<i>Chinese hamster ovary cells</i> (Zelllinie K1)
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
cRNA	<i>copy RNA</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EsV-1	Ectocarpus siliculosus Virus
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (aus <i>Aequoria victoria</i> )
HEK293	<i>human embrionic kidney cells</i> (Zelllinie 293)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
I	Strom
ICTV	Internationales Comitee zur Taxonomy der Viren
Ii	instantaner Strom
Iss	stationärer (engl. <i>steady-state</i> ) Strom
kb	Kilobasen
Kcv	Kaliumkanal aus Chlorellavirus
kDa	Kilodalton
Kev	Kaliumkanal aus Ectocarpusvirus
M	mol pro Liter
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i> – <i>time of flight</i>
min	Minute/n
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mosm	milliosmolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl der Versuchswiederholungen
ORF	<i>open reading frame</i>
p.i.	<i>post infection</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBCV-1	Paramecium bursaria Chlorella Virus
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFU	<i>plaque forming units</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>

RLM	<i>RNA ligase-mediated</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
T	Thymin
TAP	<i>tobacco acid phosphatase</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TM2	Transmembrandomäne 2
Tris	Tri(hydroxymethyl)methylamin
UV	Ultraviolett
V	Spannung

### *Aminosäuren, Ein- und Dreibuchstabencode*

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Asparaginsäure	L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
E	Glu	Glutaminsäure	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin	X		unbestimmt

Teile dieser Arbeit sind in die folgenden Publikationen eingegangen:

Mario Mehmel, Maike Rothermel, Tobias Meckel, James L. Van Etten, Anna Moroni, Gerhard Thiel (2003) Possible function for virus encoded K<sup>+</sup> channel Kcv in the replication of chlorella virus PBCV-1. FEBS Letters 552, 7-11

Ming Kang, Michael Graves, Mario Mehmel, Anna Moroni, Sabrina Gazzarrini, Gerhard Thiel, James R. Gurnon, James L. Van Etten. Genetic diversity in chlorella viruses flanking *kcv*, a gene that encodes a Potassium ion channel protein. Virology 326, 150-159

Diese Arbeit wurde am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. Gerhard Thiel angefertigt und wurde durch ein Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs 340 „Kommunikation in biologischen Systemen“ von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

## DANKSAGUNG

Ich danke Prof. Dr. Gerhard Thiel für die freundschaftliche Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Danke, für die Impulse, Flüsse und auch Widerstände. Prof. Dr. James Van Etten danke ich für die Einladung in seinem Labor zu arbeiten. Und dafür, dass er auch mich mit diesen faszinierenden Viren infiziert hat. James Gurnon und allen anderen im *Van Etten-Lab* danke ich für die großartige Unterstützung, die mir die Zeit in Lincoln zu einem Vergnügen gemacht hat.

Weiter danke ich Prof. Dr. Anna Moroni und Dr. Sabrina Gazzarrini für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Arbeiten mit *Xenopus*-Oozyten. ..und Giulio danke ich für einen Platz in seiner Kammer.

Bei Dr. Nicolas Delaroque bedanke ich mich für einen Agaroseblock mit Ectocarpusvirus-DNA, der den Verlauf meiner Arbeit entscheidend mitgeprägt hat. Ich danke Prof. Dr. Thomas Holstein für die Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten. Außerdem für Proben isolierter Hydra-Zoochlorellen und - nicht zuletzt - für die Möglichkeit Mikroskope in seinem Labor zu benutzen. Für ihre Anregung zu Experimenten danke ich außerdem Prof. Dr. Felicitas Pfeifer. Prof. Dr. Wolfram R. Ullrich danke ich für die Durchsicht des Manuskripts zu dieser Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern der AG-Thiel bedanke ich mich für die schöne gemeinsame Zeit. Für viele Anregungen, gute Musik (Dipl. Biol. Hans Henrik von Rosenberg-Lipinski) und schlechte Musik (Hr. Florian Frohns). Ich danke für die Unterstützung bei Problemen mit der Elektrophysiologie (Dr. Ulrike Homann), der Molekularbiologie (Dr. Annette Hurst) und der Kultur aller nur denkbaren Organismen (Fr. Gisela Marx). Ich danke für die immer aktuellen Informationen aus der Welt des Sports (Hr. Jörg Balß) und für die Einblicke in das Leben von Weißrussen (Dr. Svetlana Epimashko) und Deutschen (Dipl. Biol. Astrid Elter). Dr. Cinzia Pagliuca danke ich für die Informationen zum Kcv-Protein aus ihrer laufenden Arbeit. Besonders danke ich Dipl. Biol. Brigitte Hertel für den regen Informationsaustausch und die gemeinsam ver-*patchte* Zeit. Dipl. Biol. Tobias Meckel danke ich für wichtige Anregungen zu Experimenten und seine Unterstützung am CLSM - und für *funky vibes*.

Meiner Familie - Kerstin und Malin - danke ich für ihre endlose Geduld und ihre teure Unterstützung.

## **LEBENS LAUF**

Mario Mehmel,  
geboren am 8.10.19070 in Büdingen

- |           |   |
|-----------|---|
| 1981-1991 | Wolfgang-Ernst-Gymnasium, Büdingen; Abitur  |
| 1991-1993 | Ausbildung zum Offset-Drucker; Abschluss: 24. Juni 1993   |
| 1993-1995 | Zivildienst   |
| 1995-2001 | Studium der Biologie an der Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg  |
| 2000-2001 | Diplomarbeit an der TU Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W.R. Ullrich und Prof. Dr. C. Stöhr; Abschluss: Dipl.-Biol. am 26.04.01 |
| 2001-2004 | Promotionsstudium am Botanischen Institut der TU Darmstadt  |
| 2001      | Forschungsaufenthalt an der University of Nebraska, Lincoln, NE, USA, im Labor von Prof. Dr. J.L. Van Etten                                 |

## **ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Mario Mehmel, Darmstadt, den 30.April 2004